



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS ACEITES  
ESENCIALES EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA  
MASTITIS EN BOVINOS**

**Jovanna Marcela Suárez Barreiro**



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y  
SANIDAD ANIMAL**

**TESIS DOCTORAL:**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS ACEITES  
ESENCIALES EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA  
MASTITIS EN BOVINOS**

**AVALUACIÓ DE LA CAPACITAT DELS OLIS ESSENCIALS EN  
LA PREVENCIÓ I CONTROL DE LA MASTITIS A BOVINOS**

**EVALUATION OF THE CAPACITY OF ESSENTIAL OILS IN THE  
PREVENTION AND CONTROL OF MASTITIS IN BOVINE**

**JOVANNA MARCELA SUAREZ BARREIRO**

**DIRECTORA Y TUTORA:**

**DRA. MARÍA ÀNGELS CALVO TORRAS**

**DEPARTAMENTO DE SANIDAD Y ANATOMÍA ANIMAL  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**2019**



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**LA DOCTORA MARÍA ÁNGELS CALVO TORRAS CATEDRÀTICA DEL  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD Y ANATOMÍA ANIMAL DE LA FACULTAD DE  
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA CERTIFICA:**

Que el Trabajo titulado: **“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS ACEITES  
ESENCIALES EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA MASTITIS EN BOVINOS”**  
cuya autora es Jovanna Marcela Suárez Barreiro, ha sido realizado bajo su dirección y  
cumple con las condiciones exigidas para optar al título de Doctora por la Universidad  
Autónoma de Barcelona.

Bellaterra, septiembre de 2019

**DRA. MARÍA ÁNGELS CALVO TORRAS**  
Directora y tutora

  
**JOVANNA MARCELA SUÁREZ**  
Doctoranda

## **AGRADECIMIENTOS**

*A las doctoras María Angéls y Martha Cecilia, por su apoyo incondicional, sus aportes y valiosa asesoría.*

*A la Universidad Autónoma de Barcelona y la Universidad Nacional de Colombia por apoyar mi formación y el desarrollo de la investigación.*

*A la Asociación de productores de leche de Chocontá por abrirme el espacio para realizar los ensayos y su apoyo.*

*A la Fundación CEIBA – Alcaldía de Bogotá por financiar mi sostenimiento mediante la Beca Rodolfo Llinás.*

*A mis padres y hermanas por su ayuda, confianza y ánimo.*

*A mi hija por su amor, que me hace capaz de mover el mundo.*

## RESUMEN

La mastitis bovina es la enfermedad de mayor impacto económico para la industria lechera. Siendo el *Staphylococcus aureus* uno de los principales agentes patógenos involucrados, algunas de estas cepas son resistentes a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos haciendo más difícil el control y tratamiento de esta enfermedad ocasionando grandes pérdidas económicas para los productores. La Organización Mundial de la Salud ha declarado la resistencia a los antibióticos como una de las mayores amenazas a la salud humana, la seguridad alimentaria y el desarrollo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de aceites esenciales para la prevención y control de la mastitis bovina en Cundinamarca – Colombia mediante el desarrollo de tres fases: 1. Una fase preliminar para la obtención, caracterización de principales componentes y evaluación de la citotoxicidad de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (L), *Lippia organoides* (Mill) y *Lippia citriodora* (L'He'r.); 2. Una fase *in vitro* que evaluó la actividad antimicrobiana, la sinergia de la mezcla de estos aceites esenciales y determinó la concentración mínima bactericida, frente a cepas aisladas de casos clínicos de mastitis de la región, del género *Staphylococcus spp* (N=80) y *S. aureus* Oxacilina- resistente (n=15) mediante la técnica de disco de Kirby-Bauer (Bernal & Guzman, 1984) y la técnica de micro dilución en caldo (CLSI, 1999). Y una tercera fase *in vivo* que contempló tres etapas: diagnóstico de los hatos lecheros, formulación de un sellador de barrera para bovinos a base de aceites esenciales y evaluación a través de dos estudios: un estudio preventivo (N=14 pezones) y un estudio control de mastitis (N=33 pezones) realizado en un total de 12 animales comparado frente a sellador a base de una solución yodófora comercial en el grupo de control.

Para el análisis estadístico se calcularon los tamaño de la muestra con GRANMO 7.12 y el paquete estadístico IBM SPSS y se concluyó la diferencia significativa a un  $p < 0.05$ .

Los principales compuestos caracterizados de acuerdo al método analítico para caracterización de aceites esenciales, cromatografía de gases y la espectrometría de masa, son limoneno, neral y geranial, y el timol, responsables de la capacidad antimicrobiana, se pueden explorar otras plantas aromáticas para incrementar los porcentajes de estos compuestos y mejorar la eficiencia.

La citotoxicidad de estos aceites, determinada con el bioensayo de toxicidad de *Artemia* (Meyer, y otros, 1982) está en un rango  $CL_{50}$  10-19  $\mu\text{g/ml}$ , comparando con la  $CL_{50}$  y dosis de otros agentes microbianos como Triclosan e Itraconazol, son poco tóxicos y seguros.

De otra parte, en la evaluación de la actividad antimicrobiana, se concluye que existen diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas frente a los aceites esenciales de *Lippia citriodora* (AEC) y *Thymus vulgaris* (AET) mostrando una actividad antimicrobiana ( $p < 0.05$ ), así como una sensibilidad de estas cepas frente al Cloranfenicol y una resistencia a la Clindamicina ( $p < 0.05$ ). El *Staphylococcus aureus* presenta mayor resistencia frente a los antibióticos convencionales sin embargo mantiene la sensibilidad frente a los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Thymus vulgaris*. Igualmente, se concluye que existe efecto sinérgico de la mezcla de aceites esenciales (75% AEC /25% AET) que potencia su actividad antimicrobiana optimizando su eficiencia terapéutica ( $p < 0.05$ ). La concentración mínima bactericida (CBM) de la mezcla (75% AEC /25% AET) fue determinada en 2.5% efectiva para el 92.5 % de las muestras ( $n=80$ ) Igualmente se concluye que existe correlación entre la CMB y los halos de inhibición evaluados ( $p<0.05$ ).

En los estudios *In vivo* que evaluaron la prevención y control de la mastitis bovina se concluye con un nivel de confianza del 95%, que no existen diferencias significativas entre el grupo sellador a base de aceites esenciales y el sellador a base de la solución yodófora. Es decir, alcanza a ser igualmente efectivo que el producto comercial.

Por lo anterior, se concluye que los aceites esenciales evaluados son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos predominantes de la mastitis en bovinos y son una posible estrategia para su prevención y control. Pueden ser una estrategia para disminuir el uso profiláctico de antibióticos y contrarrestar a las bacterias resistentes a antibióticos.



## ABSTRACT

Bovine mastitis is the disease with the most significant economic impact for the dairy industry. Being the *Staphylococcus aureus* one of the primary pathogens involved, some of these strains are resistant to  $\beta$ -lactam antimicrobials making it more difficult to control and treat this disease, causing high economic losses for producers. The World Health Organization has declared antibiotic resistance as one of the greatest threats to human health, food security, and development. The objective of this research was to evaluate the use of essential oils for the prevention and control of bovine mastitis in Cundinamarca - Colombia through the development of three phases: 1. A preliminary phase for obtaining, characterization of principal components and evaluation of cytotoxicity of the essential oils of *Thymus vulgaris* (L), *Lippia origanoides* (Mill) and *Lippia citriodora* (L'He'r.); 2. An in vitro phase that evaluated the antimicrobial activity, the synergy of the mixture of these essential oils and determined the minimum bactericidal concentration, compared to isolated strains of clinical cases of mastitis in the region, of the genus *Staphylococcus spp* (N = 80) and *S. aureus Oxacillin-resistant* (n = 15) through the Kirby-Bauer disc technique (Bernal & Guzman, 1984) and the broth micro dilution technique (CLSI, 1999). And a third phase in vivo that contemplated three stages: diagnosis of dairy herds, formulation of a barrier sealant for bovines based on essential oils and evaluation through two studies: a preventive study (N = 14 nipples) and a study control (N = 33 nipples) performed on a total of 12 animals with control groups treated with sealant based on a commercial iodophor solution.

For the statistical analysis, the sample size was calculated with GRANMO 7.12, and the IBM SPSS statistical package, and the significant difference was concluded at  $p < 0.05$ .

The main compounds characterized according to the analytical method for the characterization of essential oils, gas chromatography, and mass spectrometry, are

limonene, neral, and geranial, and thymol, responsible for antimicrobial capacity, other aromatic plants can be explored to increase percentages of these compounds and improve efficiency.

The cytotoxicity of these oils, determined with the *Artemia* toxicity bioassay (Meyer, et al., 1982) is in a 10-19 µg / ml LC50 range, compared with the LC50 and doses of other microbial agents such as Triclosan and Itraconazole, are less toxic and safe.

On the other hand, in the evaluation of antimicrobial activity, it is concluded that there are significant differences in the sensitivity of *Staphylococcus spp.* isolated against the essential oils of *Lippia citriodora* (AEC) and *Thymus vulgaris* (AET) showing an antimicrobial activity ( $p < 0.05$ ), as well as a sensitivity of these strains against Chloramphenicol and resistance to Clindamycin ( $p < 0.05$ ). *Staphylococcus aureus* exhibits greater resistance against conventional antibiotics, great it maintains sensitivity to the essential oils of *Lippia citriodora* and *Thymus vulgaris*. Likewise, it is concluded that there is a synergistic effect of the mixture of essential oils (75% AEC / 25% AET) that enhances its antimicrobial activity optimizing its therapeutic efficiency ( $p < 0.05$ ). The minimum bactericidal concentration (CBM) of the mixture (75% AEC / 25% AET) was determined in 2.5% effective for 92.5% of the samples ( $n = 80$ ) It is also concluded that there is a correlation between the CMB and the halos of inhibition evaluated ( $p < 0.05$ ).

In the In vivo studies that evaluated the prevention and control of bovine mastitis, it is concluded with a 95% confidence level, that there are no significant differences between the sealant group based on essential oils and the sealer based on the iodophor solution. That is, it becomes equally effective as the commercial product.

Therefore, it is concluded that the essential oils evaluated are capable of inhibiting the growth of the more relevant microorganisms of mastitis in cattle and are a possible strategy for their prevention and control. They can be a strategy to reduce the prophylactic use of antibiotics and counteract antibiotic-resistant bacteria.

## ABREVIACIONES

AET Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

AEC Aceite esencial de *Lippia Citriodora*

CCS Recuento de células somáticas

CMB Concentración mínima bactericida

CMI Concentración mínima inhibitoria

CMT Prueba California para mastitis

PIB Producto Interno Bruto

OMS Organización Mundial de la Salud

*S. aureus* *Staphylococcus aureus*

*spp* Se refiere todas las especies individuales dentro de un género

SPSS Statistical Package for the Social Sciences

# INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIACIONES</b>	<b>10</b>
<b>INDICE</b>	<b>11</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>14</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1 PRODUCCIÓN DE LECHE EN COLOMBIA	19
2.2 INCIDENCIA DE MASTITIS EN CUNDINAMARCA	21
2.2.1 LA MASTITIS BOVINA	22
2.3 PLANTAS MEDICINALES Y ETNOVETERINARIA: EN MASTITIS BOVINA	24
2.3.1 <i>Lippia origanoides</i> (Orégano de monte)	26
2.3.2 <i>Syzygium aromaticum</i> (Clavo)	27
2.3.3 <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	29
2.3.4 <i>Guazuma ulmifolia</i> (Guásimo)	30
2.3.5 <i>Achyrocline Bogotensis</i> (Vira- Vira)	32
2.3.6 <i>Lippia citriodora</i> (Cedrón)	34
<b>3 OBJETIVO E HIPÓTESIS</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.3 HIPÓTESIS PLANTEADA	36
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>

4.1	FASE PRELIMINAR	38
4.2	FASE <i>IN VITRO</i>	38
4.3	FASE <i>IN VIVO</i>	39
<b>5</b>	<b>FASE PRELIMINAR: EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CITOTOXICIDAD DE LOS ACEITES</b>	
	<b>ESENCIALES</b>	<b>40</b>
5.1	DETERMINACIÓN DE COMPONENTES EN LOS ACEITES ESENCIALES	42
5.2	EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	43
<b>6</b>	<b>FASE <i>IN VITRO</i>. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES Y ANTIBIÓTICOS SOBRE</b>	
	<b>MICROORGANISMO DE IMPORTANCIA EN MASTITIS BOVINA</b>	<b>47</b>
6.1	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS	47
6.2	TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN DISCO KIRBY BAUER	50
6.3	PRODUCTOS NATURALES EVALUADOS	50
<b>7</b>	<b>FASE <i>IN VITRO</i>. EFECTO SINÉRGICO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MEZCLA DE ACEITES</b>	
	<b>ESENCIALES EN LA MASTITIS BOVINA</b>	<b>55</b>
7.1	MICROORGANISMOS	55
7.2	ACEITES ESENCIALES Y ELABORACIÓN DE LA MEZCLA	56
7.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
<b>8</b>	<b>FASE <i>IN VITRO</i>. SCREENING DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i></b>	
	<b>OXACILINA RESISTENTE AISLADOS DE CASOS CLÍNICOS DE MASTITIS BOVINA</b>	<b>62</b>
<b>8.1</b>	<b>ACEITES ESENCIALES FRENTE A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> OXACILINA RESISTENTE</b>	<b>62</b>
8.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> OXACILINA RESISTENTE	63
8.2.1.1	Análisis Estadístico	64
<b>9</b>	<b>FASE <i>IN VITRO</i>. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA</b>	
	<b>65</b>	
9.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66

<b>10</b>	<b>FASE IN VIVO. EVALUACIÓN DE UN SELLADOR DE BARRERA A BASE DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE MASTITIS BOVINA</b>	<b>68</b>
10.1	ETAPA DIAGNÓSTICA	69
10.1.1	<i>Localización y periodo de estudio</i>	69
10.1.2	<i>Hato lechero</i>	70
10.1.3	<i>Estado de animales y pezones</i>	70
10.1.3.1	Prueba de California para Mastitis (CMT)	70
10.1.3.2	Recuento de células somáticas por microscopia directa	71
10.1.3.3	Evaluación microbiológica por cultivo	72
10.2	ETAPA FORMULACIÓN	74
10.3	ETAPA DE EVALUACIÓN	76
10.3.1	<i>Diseño experimental</i>	76
10.3.2	<i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	77
10.3.3	<i>Variables y periodicidad</i>	78
10.3.4	<i>Estudio 1. Preventivo de mastitis</i>	79
10.3.5	<i>Estudio 2. Control de mastitis</i>	82
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>12</b>	<b>PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>89</b>
<b>13</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>90</b>
<b>14</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>98</b>

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Respuesta al proceso inflamatorio en la glándula mamaria</i>	23
<i>Figura 2 ESPECIES DE PLANTAS MEDICINALES COLOMBIA</i>	25
<i>Figura 3 Metodología de investigación</i>	37
<i>Figura 4 Sistema de destilación por arrastre de vapor</i>	41
<i>Figura 5 Bioensayo de Citotoxicidad con Artemia</i>	44
<i>Figura 6 Efecto de la concentración de aceite esencial sobre la mortalidad de Artemia (% mortalidad vs concentración [c] µg/ml)</i>	45
<i>Figura 7 regresión estadística con el modelo Probit de los aceites esenciales</i>	45
<i>Figura 8 Delimitación zona / porcentaje participación de muestreo</i>	48
<i>Figura 9 Incidencia por microorganismos en casos positivos Mastitis Bovina</i>	49
<i>Figura 10 Técnica de difusión Kirby Bauer</i>	50
<i>Figura 11 actividad antimicrobiana plantas vs antibióticos N=80</i>	52
<i>Figura 12 Sensibilidad frente antibióticos y aceites esenciales Staphylococcus aureus n=37</i>	53
<i>Figura 13 Inhibición para las mezclas evaluadas</i>	59
<i>Figura 14 Incremento halos inhibición</i>	59
<i>Figura 15 Concentración Mínima Bactericida</i>	65
<i>Figura 16 Evidencia de crecimiento</i>	66
<i>Figura 17 Etapas evaluación del sellador a base de aceites esenciales</i>	69
<i>Figura 18 Capilaridad en el canal del pezón</i>	75
<i>Figura 19 Sellador a base de aceites esenciales</i>	76
<i>Figura 20 Diseño experimental</i>	77
<i>Figura 21 estudio 1. prueba de california</i>	79
<i>Figura 22 estudio 1. Conteo de células somáticas microscopia directa</i>	80
<i>Figura 23 Estudio 1. cultivo microbiológico muestra en leche</i>	81
<i>Figura 24 estudio 2. prueba de california</i>	83
<i>Figura 25 estudio 2. Células somáticas microscopia directa</i>	84
<i>Figura 26 DESCENSO CCS PEZÓN N 12</i>	84
<i>Figura 27 estudio 2. cultivo microorganismos en muestra de leche</i>	85

## INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Cifras de destino de ganado en Colombia (Dane, 2016)</i>	20
<i>Tabla 2 Criterios selección plantas</i>	35
<i>Tabla 3 compuestos aceite esencial de Lippia citriodora</i>	42
<i>Tabla 4 compuestos aceite esencial Thymus vulgaris</i>	43
<i>Tabla 5 Compuestos aceite esencial Lippia origanoides</i>	43
<i>Tabla 6 CL50 aceites esenciales y agentes antimicrobianos de referencia</i>	46
<i>Tabla 7 Análisis tamaño de la Muestra: Programa Granmo 2015</i>	49
<i>Tabla 8 Actividad antimicrobiana Estadística descriptiva Productos Naturales</i>	52
<i>Tabla 9 Tablero concentraciones AET/AEC</i>	57
<i>Tabla 10 Mezclas con actividad antimicrobiana (Sin actividad )</i>	58
<i>Tabla 11 Halo inhibición expresado en mm</i>	60
<i>Tabla 12 Prueba de Mann-Whitney</i>	60
<i>Tabla 13 Halos de inhibición de Staphylococcus aureus-Oxacilina resistente para los aceites esenciales y la mezcla (n=15)</i>	64
<i>Tabla 14 Concentración mínima bactericida</i>	66
<i>Tabla 15 Prueba de Rho Spearman</i>	67
<i>Tabla 16 Reacciones test de california.</i>	71
<i>Tabla 17 Resultados diagnóstico de mastitis por pezón</i>	72
<i>Tabla 18 Criterios de inclusión</i>	78
<i>Tabla 19 variables a evaluar</i>	78
<i>Tabla 20 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra</i>	81
<i>Tabla 21 Prueba t evaluar diferencias entre los dos tratamientos -ensayo 1</i>	82
<i>Tabla 22 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra- ensayo 2</i>	85
<i>Tabla 23 Prueba t evaluar diferencias entre los dos tratamientos -ensayo 2</i>	86



# 1 INTRODUCCIÓN

*«La naturaleza es el gran médico y  
el hombre posee a éste en sí mismo»*

*Paracelso*

Desde la alquimia, la destilación tenía un significado místico para extraer los aceites esenciales de las plantas medicinales, era el éter de las plantas, el espíritu de la planta que se sublevaba a través del vapor para ser luego conservado como elixir en frascos oscuros protegidos del sol para garantizar su pureza. Como si se tratara de un nuevo ser capturado y retenido para no dejarlo escapar que se emplea en pócimas farmacéuticas con fines curativos. Cuando se habla de aceites esenciales se asocia también con aromas, y efectivamente los aromas son los componentes de la planta que producen su olor característico.

Pero el aceite esencial de una planta va más allá, es la huella digital de la planta, en él está la identificación de sus metabolitos secundarios, los componentes que se generan por la interacción con el hábitat y de los cuales no dependen totalmente la fotosíntesis. La planta al ser influenciada por el clima, suelo, aire, y sol que recibe, el aceite esencial es casi único por cultivo. Las farmacopeas estandarizan composiciones mínimas de metabolitos de interés, pero no pueden determinar la composición exacta de un aceite como se realiza con un fármaco sintético. Estos metabolitos también responden a todo el hábitat en su conjunto incluyendo bacterias, hongos, virus, y demás seres que rodean la planta.

La cantidad de rayos UV y la capacidad de absorción de un suelo rico en sílice también estimula la producción de estos, como en el caso de la zona Mediterránea por las características de los suelos y el caso de la línea del Ecuador que recibe sol durante todo el año; lo que beneficia el cultivo de la familia de las *Lamiaceae*, en donde se incluyen la mayoría de plantas aromáticas.

Estos metabolitos actúan de forma articulada en la planta, por esto, no era del todo equivocada la visión renacentista de la Alquimia, el aceite esencial es entonces, el extracto del conjunto de los principales componentes que actúan vinculados y que son únicos por cultivo.

Las propiedades de los aceites esenciales también se han evaluado desde tiempo remotos, como antifúngicos, antimicrobiales, antivirales, antitumorales, conservante de alimentos, entre otras. Sin embargo, se requieren estudios rigurosos que evalúen su potencial desde la farmacología frente a enfermedades con el desarrollo de estudios preclínicos y clínicos.

De otra parte, la Organización Mundial de la Salud, tiene como objetivo reducir las enfermedades infecciosas y ha establecido la resistencia antimicrobiana como amenaza a la salud pública, requiriendo la exploración de nuevas estrategias para la prevención y control de la proliferación de agentes patógenos. Una de estas enfermedades de gran interés por las repercusiones en el sector productivo, es la mastitis bovina infecciosa, que requiere del estudio de nuevos agentes antimicrobianos que reemplace el uso profiláctico de los antibióticos, sean efectivos para bacterias resistentes y de esta forma puedan prevenir esta enfermedad.

En este sentido, la investigación tiene como objetivo evaluar el uso potencial de aceites esenciales para la prevención y control de la mastitis bovina, desarrollado en el departamento de Cundinamarca –Colombia. Inicialmente, se hace una revisión

bibliográfica del contexto productivo de leche en el país y la relevancia del departamento de Cundinamarca en este sector agrícola. Seguido de la incidencia de mastitis bovina en la región y las pérdidas económicas que ocasiona, así como las prácticas etnoveterinarias a través del empleo de plantas medicinales para el tratamiento de la mastitis.

A partir de esta información, se seleccionan las especies a evaluar y se plantea como hipótesis nula “Los aceites esenciales evaluados son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos predominantes de la mastitis en bovinos y son una posible estrategia para su prevención”.

Para evaluar la hipótesis, la investigación se desarrolla en tres fases, una fase preliminar de extracción, caracterización y evaluación de la citotoxicidad de los aceites esenciales. Una segunda fase *in vitro* en la cual se realiza la exploración de la capacidad antimicrobiana de los aceites en aislados de casos clínicos de mastitis bovina en la región y bacterias resistentes a la Oxacilina. Una última fase *in vivo*, en la cual se realizan dos estudios preventivo y control de mastitis, comparando un sellador a base de aceites esenciales frente a un producto comercial a base de yodo, avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUCCIÓN DE LECHE EN COLOMBIA

La industria de la leche en Colombia es reconocida en la región Andina por ser una de las más importantes, por debajo de Brasil, Argentina y México; representando un 24.3% del PIB en el sector. De los 32 departamentos del país, 22 departamentos son productores de leche y aportan el 0.83% del PIB nacional según estadísticas de 2017, obteniendo alrededor de 7000 millones de litros de leche bovina al año (Conpes, 2010). Los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Boyacá son los que sobresalen debido a la calidad de suelos, cantidad de vacas, manejo de nutrientes y otros factores, en estos departamentos se concentra el 50% de la producción nacional. Específicamente en la zona denominada “sabana de Bogotá”, se genera el 19% del total de leche de esta industria en el país, generando 800.000 empleos directos aproximadamente (Minagricultura, 2019).

Los índices de consumo dependen de la estratificación social del país, debido a la brecha económica y al subdesarrollo, la población se clasifica por estratos económicos, el mayor consumo de leche se da mayoritariamente en los estratos altos, 198 litros (por año, por persona), y 84 litros, en niveles sociales 1, 2, (bajos); sin embargo, cabe destacar que en la región, Colombia es uno de los países que cuenta con acceso fácil a este producto, sus precios son asequibles y los altos contenidos de proteínas y de nutrientes hacen que la leche forme parte fundamental de la dieta de los colombianos.

En otros mercados también se consume leche de Colombia, según un informe de Asoleche, se exporta a Venezuela el 50% de la leche que se consume en allí, a Ecuador el 16% y a Estados Unidos el 15% (Ramirez S. , 2018).

Otro elemento importante del mercado es la destinación del ganado, en Colombia al menos 11 millones de cabezas tienen destinación de doble propósito (carne y leche a 2019), las siguientes son las cifras de uso del ganado de acuerdo con el más reciente censo agropecuario en los departamentos de mayor producción (Tabla 1), siendo el departamento de Cundinamarca el que produce la mayor cantidad de leche por animal al día, y es uno de las zonas de explotación con mayores rendimientos:

**TABLA 1 CIFRAS DE DESTINO DE GANADO EN COLOMBIA (DANE<sup>1</sup>, 2016)**

<b>Departamento</b>	<b>Lechería especializada</b>	<b>Doble propósito</b>	<b>Total</b>	<b>Litros / vaca / día</b>
Antioquia	762.574	503.467	1.266.041	11.4
Cundinamarca	454.434	341.242	795.676	15.7
Boyacá	239.635	437.118	676.753	6.5
Magdalena	180.392	838.033	1.018.425	2.3
Cesar	320.906	783.625	1.104.531	3.1
Bolívar	432.767	373.690	806.457	2.7
Córdoba	534.074	993.649	1.527.723	3.2
Nariño	254.072	53.965	308.037	8.7
<b>Total Nacional</b>	<b>3.998.374</b>	<b>8.094.180</b>	<b>12.092.554</b>	<b>6.3</b>

Así mismo, respecto a la calidad de la leche por regiones resulta importante indicar que en el país, mediante la Resolución 017 de 2012 del Ministerio de Agricultura se agrupan las regiones de acuerdo con su nivel productivo y se mide la calidad mediante índices

---

<sup>1</sup> Departamento Nacional de Planeación en Colombia

generales de importancia para la industria: calidad composicional de proteína, grasa y sólidos totales (Conpes, 2010). La Región 1 se encuentra conformada por Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Quindío, Risaralda, Caldas, Nariño, Cauca y Valle del Cauca, con índices de 23.38, 7.79 y 7,02 (\$/gramo), los más altos del país. Seguidos de la región 2, conformada por Cesar, Guajira, Atlántico, Bolívar Sucre, Córdoba, Chocó, Magdalena, Norte de Santander, Santander, Caquetá, Tolima, Huila, Meta, Orinoquía y Amazonía con valores promedio de 21.09, 8.27 y 7.84 (\$/gramo) (USP- MADR, 2018).

La calidad de la leche ha mejorado en los últimos 5 años y la que más se acerca a los estándares de calidad nacionales es la de la región 1. De acuerdo con los estudios realizados, la que proviene de Cundinamarca dado que es una de las leches de mejor calidad en el país, dada la tradición lechera, las plantas de tratamiento, el cuidado del ganado y la alimentación del animal.

## 2.2 INCIDENCIA DE MASTITIS EN CUNDINAMARCA

Respecto a las enfermedades, es necesario señalar que la mastitis es la enfermedad de mayor incidencia en los hatos del país, disminuyendo entre un 10 a un 80% la producción de leche del animal. En Cundinamarca por ejemplo tiene una incidencia de 28%, que puede afectar aproximadamente a 250 mil vacas y disminuir la producción en 4 millones de litros diarios, justamente uno de los principales síntomas de la enfermedad es la disminución de las características de calidad y cantidad (Conpes, 2010).

Las pérdidas por esta enfermedad son las más graves que presenta el sector, por cuanto implica desde el tratamiento del animal hasta abortos, problemas reproductivos y puede causar la muerte aunque en un bajo porcentaje. Dentro de los elementos más

importantes para este departamento se encuentra el ordeño e inclusive hay estudios que revelan incidencia de un 60% de mastitis lo cual implica graves pérdidas dado que solamente el tratamiento puede llegar a costar entre 400 y 500 euros, junto con la leche no apta para consumo humano por los altos índices de antibióticos y el tiempo de espera para el animal, así mismo la leche tiene un menor espectro de comercialización considerando que las bacterias asociadas con la enfermedad afectan la durabilidad de la leche (Ramirez S. , 2018).

El costo de los tratamientos aumenta el costo de la leche en un 15% y en los casos en los cuales se pretende sacar subproductos como el queso, el costo aumenta dado que disminuyen las calidades grasas y es necesario usar el doble de litros para la elaboración del mismo.

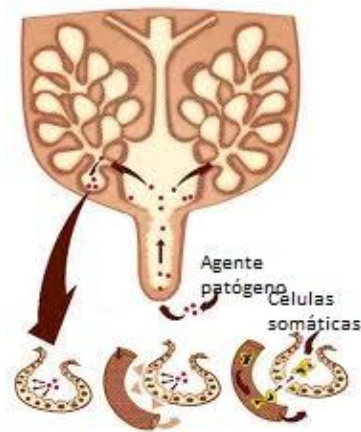
No obstante vale la pena destacar que dentro de los 3 departamentos con mayor producción es donde se concentran la mayor cantidad de esfuerzos de capacitación a los propietarios de las fincas para mejorar los métodos de ordeño, manipulación e higiene.

### 2.2.1 LA MASTITIS BOVINA

La mastitis es una respuesta inflamatoria del tejido de la ubre que puede ser originada por una lesión física o más comúnmente por una infección bacteriana. Esta respuesta inflamatoria consiste en un incremento de proteínas en sangre y glóbulos blancos, que con el propósito de reparar y restaurar la ubre se posicionan en el tejido mamario y finalmente terminan en la leche (Erskine, Cullor, Schaellibaum, Yancey, & Zecconi, 2004)(figura 1).

Específicamente la mastitis infecciosa, es generada porque los agentes patógenos han atravesado el canal del pezón y suben hasta la cisterna del anillo, en ese punto los

capilares sanguíneos transporta los glóbulos blanco para contrarrestar la infección y se transportan hasta el tejido mamario, donde se encuentran las células secretoras de leche (Calvinho, 2010).



**FIGURA 1 RESPUESTA AL PROCESO INFLAMATORIO EN LA GLÁNDULA MAMARIA**

Fuente: Modificado de (Echeverría, 2017)

Es por esto, que en el momento del ordeño, la leche de una vaca con mastitis infecciosa contienen un elevado número de células somáticas por mililitro y bacterias patógenas que en ocasiones según el grado de infección se puede observar después de la tinción en el microscopio. Además, las toxinas generadas por las bacterias patógenas dañan las células epiteliales secretoras de leche, y como consecuencia la producción también se ve afectada. La mastitis infecciosa se puede desarrollar en periodo de lactación o periodo seco, en el primer caso, la infección es generada regularmente por malas prácticas en el ordeño, falta de higiene y mala manipulación. Al ordeñar el canal del pezón queda dilatado entre 1-2 horas, si no se realiza el sellado con un agente antimicrobiano, se facilita el ingreso de bacterias patógenas que permanecen en el ambiente (Calvinho, 2010).



La mastitis que se desarrolla en el periodo seco, se genera posterior a la lactancia, cuando aún no se forma un tapón natural de queratina (periodo de 2-8 semanas) dado que el canal queda abierto y es propenso al ingreso de microorganismos ambientales. Es por esto, que existen productos intramamarios que emplean antibióticos profilácticos para prevenir posibles infecciones bacterianas, lo que genera dos consecuencias indeseadas: la resistencia antimicrobiana y residuos de antibióticos en leche. Al considerar que la población infantil menor a 7 años consume en mayor proporción la leche, esto se convierte en un problema de salud pública. Por lo anterior, se han venido desarrollando productos que formen barrera en el canal del pezón, así como tapones de silicona o pastas, entre otros; a fin de evitar la mastitis (Kutscher, 1998).

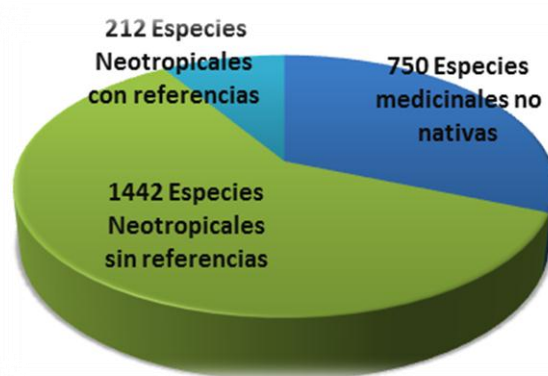
### 2.3 PLANTAS MEDICINALES Y ETNOVETERINARIA: EN MASTITIS BOVINA

Las plantas medicinales se han usado desde tiempo remotos que datan a más de 4.000 años de antigüedad, sin embargo, en los últimos años se ha inusitado un auge en las investigaciones de distintas ramas científicas con el propósito de verificar los saberes ancestrales y descubrir su verdadero funcionamiento medicinal. La Organización Mundial de la Salud ha reconocido la importancia que tiene el uso de plantas medicinales en atención primaria a fin de cubrir necesidades sanitarias especialmente en países en vías de desarrollo, pero esto requiere estudios más rigurosos en relación al uso y los posibles efectos tóxicos que se puedan derivar<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Organización Mundial de la Salud 2011

En el mundo se han identificado 300.000 especies de plantas de las cuales cerca de 25.000 se encuentran en Colombia, reconociéndose 2.404 especies como plantas medicinales como patrimonio natural, cultural y medicinal del país. Sin embargo, la gran mayoría de plantas medicinales que usan en el país no cuentan referencias documentadas que evidencien su uso terapéutico como se muestra en la figura 2. (Bernal, Martínez, & Sánchez, 2011)



**FIGURA 2 ESPECIES DE PLANTAS MEDICINALES COLOMBIA**

Fuente: Bernal, Martínez, & Sánchez, 2011

De otra parte, en países desarrollados el consumo de productos orgánicos va en auge lo que conlleva a buscar alternativas ecológicas para el control y prevención de enfermedades en la producción agrícola. Específicamente en el caso de la mastitis bovina, algunas granjas de Estados Unidos utilizan estrategias alternativas para el tratamiento que incluyen productos a base de suero de leche, fitoterapia, complementos vitamínicos, entre otros.

Para el caso de la mastitis bovina se han realizado estudios *in vitro* a partir de aislados que evalúan la actividad antimicrobiana de diferentes aceites o extractos naturales entre

los cuales resalta el uso de Clavo (*Syzygium aromaticum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Igualmente se ha demostrado su capacidad antimicrobiana en aislados de mastitis bovina, específicamente para cepas de *Staphylococcus spp.* el rango de la concentración mínima inhibitoria oscila entre 800-3200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Pozzo, Santurio, Rossatto, Vargas, & Alves, 2011), por lo cual, es interesante que sea considerado como un posible tratamiento (Choi, Damte, Lee, Kim, & Park, 2012).

De otra parte, la inclusión de plantas aromáticas en la dieta de bovinos productores de leche ha mostrado que no modifica cualidades organolépticas de la leche, pero puede disminuir los niveles de lactosa, además de mantener los niveles microbiológicos de la leche adecuados para el consumo (Lacerdaa, Bauer, J.S., Silva, & Carvalho, 2014)

### 2.3.1 *Lippia origanoides* (Orégano de monte)

Familia Verbenácea

Origen: cultivada en el Neo trópico, en Colombia se cultiva en los Andes y Valle del Magdalena a 1500 - 2800 m. (Bernal, Gradstein, & Celis, 2015).

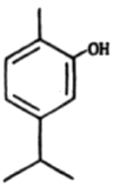
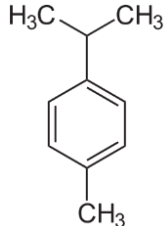
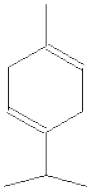
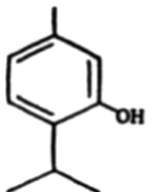
Entre las propiedades del orégano de monte se resaltan su potencial antioxidante, anti fungicida, antiespasmódica y antibacteriana principalmente, el timol y el ácido rosmarino presentes en el extracto, ayudan a disminuir los radicales libres (Olmedo, Nepote, & Grosso, 2014), igualmente se ha demostrado su capacidad como preservante de alimentos y la capacidad de combatir hongos filamentosos y levaduras, incluida la *Cándida albicans* (CMI 60mg/mL) (Pozzatti, Loreto, Mario, Rossatto, & Santurio, 2010).

Su actividad antimicrobiana está asociada al carvacrol y timol, que además tienen propiedades antiinflamatorias y estabilizan las membranas musculares en tejidos.

Diferentes estudios han demostrado su actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos como: *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella*, *Pseudomonas spp*, entre otros (Iturriaga, Olabarrieta, & Marañón, 2012),

Es una planta nativa, que crece de forma silvestre a diferentes pisos térmicos del país, la caracterización realizada en aceite esencial extraído de cultivos presentes en Colombia describen el carvacrol como principal componente (40%), seguido del p-cimeno (13%) , g-terpineno (11%) y timol (11%), según quimiotipos y zona del país la concentración de timol puede alcanzar valores superiores al 60% (Stashenko, y otros, 2010).

**Principales compuestos de la *Lippia origanoides*:**

<i>Carvacrol</i>	<i>p-cimeno</i>	<i>g-terpineno</i>	<i>timol</i>
			

2.3.2 *Syzygium aromaticum (Clavo)*

Familia Myrtaceae

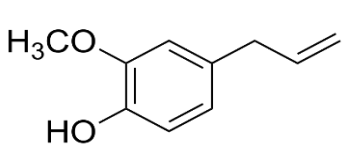
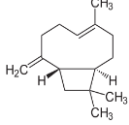
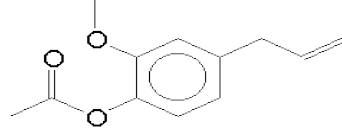
Origen: de la región Indo-Malaya; cultivada en los trópicos, en Colombia se cultiva en la Amazonia, Andes, Llanura del Caribe, Orinoquia, Pacífico, Valle del Cauca a 30 - 2350 m. (Bernal, Gradstein, & Celis, 2015)

Dentro de las propiedades se resalta su actividad antioxidante debido a los compuestos fenólicos, así como su uso desinfectante, su poder analgésico, antibacterial y

antiinflamatorio. En la industria de alimentos se ha empleado como preservante debido a su actividad antimicrobiana frente a mohos, bacterias y levaduras a fin de extender la vida útil de los alimentos procesados (Aguilar-González- & López-Malo, 2013). El aceite esencial de clavo está compuesto en gran proporción de eugenol (13-90%), al cual se le atribuye su poder antifúngicos. Ha mostrado efectividad frente al *Aspergillus fumigatus* ensayos que emplean el aceite esencial como conservante (Mohd Sajjad Ahmad Khan, 2011) así como, en cultivos *in vitro* e *in vivo* de fresas frente a *Botrytis cinerea* (Aguilar-González, Palou, & López-Malo, 2015) y frente a la *Cándida albicans* (Mansourian, Boojarpour, Ashnagar, Beitollahi, & Shamshiri, 2014), igualmente tiene una acción rápida como insecticida frente a una amplia variedad de insectos y ácaros (Santamarina, Rosello, Gimenez, & Blazquez, 2016).

Estudios confirman su actividad antimicrobiana empleándose como película comestible en el recubrimiento de árboles con el propósito de proteger la planta frente a posibles ataques microbianos, y así maximizar el rendimiento productivo pre y post cosecha (Alkan & Yemenicio, 2016). Sin embargo, no ha mostrado sinergismo frente a microorganismos patógenos de la mastitis en comparación con otros aceites esenciales como el tomillo y el orégano (Perini, y otros, 2014). La composición del aceite esencial de clavo, puede variar de la siguiente manera: eugenol 49-90%, cariofileno 4-21%, acetato de eugenilo 0.5-21% y trazas de  $\alpha$  humeleno,  $\alpha$  bergamoteno, iso eugenol, y cadineno entre otros, como se muestra a continuación (Aguilar-González- & López-Malo, 2013).

PRINCIPALES COMPUESTOS DE *SYZYGIUM AROMATICUM*

<i>Eugenol</i>	<i>Cariofileno</i>	<i>Acetato de eugenilo</i>
		

### 2.3.3 *Thymus vulgaris* (Tomillo)

Familia *Lamiaceae*

Origen: Nativa de Europa; cultivada en América, en Colombia se cultiva en la Boyacá, Cundinamarca, Santander y Valle a 2300 - 3800 m. (Bernal, Gradstein, & Celis, 2015)

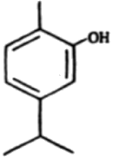
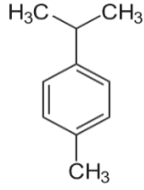
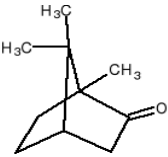
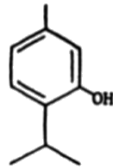
En los principales compuestos del aceite esencial de tomillo se encuentran las saponinas triterpenoides, flavonoides, cimeno, alcanfor, carvacrol y gran cantidad de timol, entre otros. El tomillo comúnmente ha sido usado en la culinaria por su olor, sabor característico y por sus propiedades antibacteriana también se ha empleado en medicina natural durante el siglo XIX y la primera mitad del siglo XX cuando aún no se empleaban los antibióticos tradicionales.

El interés en el control de enfermedades pos cosecha con el uso de aceites esenciales y compuestos volátiles para el control de fitopatógenos, en especial hongos, ha mostrado que el aceite de tomillo tiene actividad antifúngica en la conservación de papaya con una eficiencia mayor frente aceites esenciales como menta y eucalipto (Barrera & García, 2008). El timol es uno de los principales compuestos de este extracto, se han realizado distintos estudios *in vitro* relacionados con el tratamiento de la mastitis bovina (Pozzo, Santurio, Rossatto, Vargas, & Alves, 2011), uno de ellos muestran que el timol (16-64 mg/mL) puede reducir la internalización del *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas e inhibir la producción de óxido nítrico (Zhengkai, y otros, 2014). Así mismo, tiene una eficiencia muy similar al carvacrol obtenido en el aceite esencial de orégano, frente aislados (*S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *E. coli*) de mastitis bovina (Fratini, y otros, 2014).

Las concentraciones de los compuestos de la planta de tomillo varían según las condiciones de cultivo y climatológicas, sin embargo las concentraciones de los compuestos principales del tomillo pueden variar así: saponinas triterpenoides (1.0 -

2.5%), ácido ursólico (1.5%), timol (40%), p-cimeno (15-50%), alcanfor (11-16%) y carvacrol (9-10%) (Lemus & Quiñónez, 2001).

### Principales compuestos de *Thymus vulgaris*

<i>Carvacrol</i>	<i>p-cimeno</i>	<i>alcanfor</i>	<i>timol</i>
			

#### 2.3.4 *Guazuma ulmifolia* (Guásimo)

Familia Malvaceae

Origen: México, Argentina y en Colombia se cultiva en la Amazonia, Andes, Llanura del Caribe, Orinoquia, Pacífico, Valle del Cauca, Valle del Magdalena a 0 - 1800 m. (Bernal, Gradstein, & Celis, 2015)

La *Guazuma ulmifolia* se utiliza en forrajes ya sea en semilla, fruto, hoja y vástago del alto valor nutritivo para bovinos por su alto contenido de proteína (Véler & Delgador, 2009), también se ha empleado en sistemas de silvopastoreo ya sea disperso en potreros, en linderos, o intercalados con cultivos (Janzen, 1982), los animales consumen sus frutos en especial en época de sequía y sus ramas en época húmeda como dieta complementaria. (Véler & Delgador, 2009).

Es una planta usada tradicionalmente en el tratamiento de múltiples enfermedades empleando la totalidad de la planta: los frutos cocinados se usan para el tratamiento de la diarrea, resfriado y problemas renales, la corteza y las hojas se utilizan en el tratamiento de la malaria, sarampión, gripe, otras enfermedades respiratorias y enfermedades dermato mucosas. Dentro de los usos indígenas mayas de México y los indígenas del Amazonas, se resalta el empleo de esta planta para aliviar los dolores del

parto, el asma, desinfección y curación de heridas, fiebre, lepra y otras afecciones de la piel como erupciones, úlceras e infecciones (Villamizar, Mosquera, Piñeros, Muñoz, & Ospina, 2014).


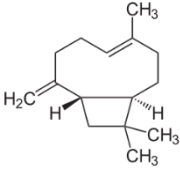
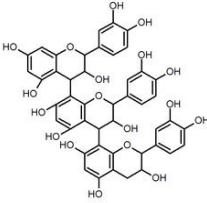
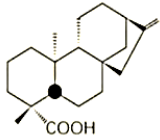
Igualmente, desde los estudios etnobotánicos de centro América, se ha reportado el uso tradicional de esta planta en el tratamiento de enfermedades de animales domésticos en Nicaragua. El estudio realizado con comunidades de distintos municipios del departamento de Estelí reporta un uso mayoritario de esta planta para el control de la diarrea, intoxicaciones, estreñimiento, úlceras cutáneas en bovinos, empleando la corteza de los tallos suministrando la tintura vía oral en una sola dosis, en una relación de 1 cortezas por 5 partes de agua, así como en baños o directamente aplicando la savia (Flores, Centeno, & Betanco, 2005).

El extracto de esta planta también presenta una alta eficiencia frente a microorganismos Gram positivos, Gram negativos y *Cándida albicans*, así como acción inmunoestimulante, actividad antiviral y actividad citotóxica contra células de carcinoma humano CA-9KB, en estudios *In vitro* (Ramírez, Virgen-Calleros, Vargas-Radillo, Salcedo- Pérez, & Barrientos-Ramírez, 2015).

De otra parte, se ha demostrado que en la corteza de la planta se pueden encontrar compuestos de interés farmacológico como bufadienólidos, cardenólidos, esteroides insaturados, flavonoides, leucoantocianinas, beta-sitosterol y terpenoides; mientras que las hojas contienen flavonoides y altos contenidos de proteína. Dentro de sus principales compuestos están los taninos y químicos antioxidantes llamados proantocianidinas., en especial procianidina B-2. Las hojas contienen además ácido kaurenóico que se ha documentado en numerosos estudios a través de los años como antibacterial y antifúngico y cafeína, cariofileno, catequinas, farnesol, entre otros (Villamizar, Mosquera, Piñeros, Muñoz, & Ospina, 2014).



## Principales compuestos de *Guazuma ulmifolia*

Farnesol,	Cariofileno	Procianidina b-2,	Ácido kaurenóico
			

### 2.3.5 *Achyrocline Bogotensis* (Vira- Vira)

Familia Asterácea

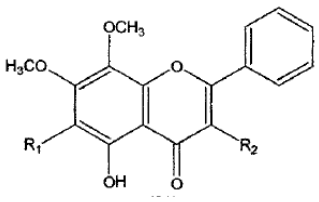
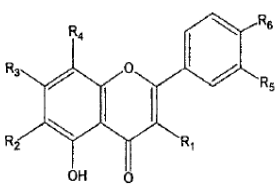
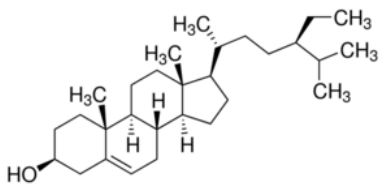
Origen: Andes, en Colombia se cultiva en la Boyacá, Cundinamarca, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Santander a 1600-4000 m. (Bernal, Gradstein, & Celis, 2015).

La planta Vira Vira pertenece a la familia *Asterácea* que incluye géneros como la artemisia, la caléndula, la scorzonera y el taraxacum, entre otras. El origen etimológico del nombre proviene del latín “áster” que significa estrella y se refiere a la forma de las inflorescencias. En Colombia se utilizan dos especies medicinales diferentes cuyo nombre común es *Vira Vira*, sin embargo, una pertenece a la especie *Achyrocline bogotensis* y la otra a *Gnaphalium bogotensis*, ambas con uso medicinal ancestral para el tratamiento de enfermedades de la piel, prostatitis, antimicrobiano y mastitis (Patiño, 2015).

Morfológicamente estas especies se pueden diferenciar por el número de flores femeninas en el radio: la especie *Gnaphalium* (30-35) tiene un número considerablemente mayor respecto a la especie *Achyrocline* (4-6) (Gattuso, y otros, 2008), sin embargo, en su composición química encontraron que ambos géneros tienen

flavonoides sin sustituyentes en el anillo B y con grupos metoxilos en el anillo A, como ocurre en la gnafalina, javerianina, metilgnafalina, etc. Según los estudios realizados en la Universidad Javeriana en Bogotá (Rico, 2009).

### Principales compuestos de *Achyrocline bogotensis*

6,7-dimetoxi-5-	hidroxiflavona: Quercetina	$\beta$ -Sitosterol
Javerianina		
$R_1=R_2=H$		
		

Existe mayor información sobre la especie *Achyrocline bogotensis*, estudios realizados en la Universidad Nacional han demostrado su actividad antibacteriana (bacteriostática: *S. aureus* y *Streptococcus*  $\beta$ . Hemolítico, Bactericida: *S. aureus*) y su actividad antifúngica. Igualmente, se evaluó su efectividad frente a micro bacterias no tuberculosas que causan infecciones de tejido superficial e hipodérmico, abscesos y enfermedades nosocomiales, con una CMI de 10 mcg/mL, una concentración muy similar a los fármacos empleados convencionalmente en el tratamiento (Patiño, 2015).

Igualmente, se ha evaluado su actividad antiinflamatoria y su actividad antioxidante, en ensayos *in vivo* en ratones, se encontró que el extracto de *Vira –Vira* administrado a una dosis de 1000 mg/kg presenta un efecto antiinflamatorio similar al diclofenaco (100 mg/kg). La actividad antioxidante es atribuida a la quercetina, uno de los principales metabolitos secundarios de esta planta, su capacidad antioxidante es equivalente a cinco veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C (Rico, 2009).

### 2.3.6 *Lippia citriodora* (Cedrón)

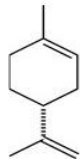
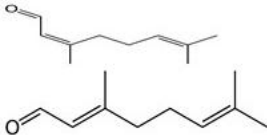
Familia Verbenácea

Origen: cultivada en Colombia en los Andes y Valle del Magdalena a 1500 - 2800 m. (Bernal, et al., 2015) Cultivada en: Cultivos ubicados Tenjo - Tabio, agricultura orgánica-cultivos en Machetá

Parte de la planta: Hojas, ramas y flor Proceso de obtención: Destilación al vapor de la planta.

En los principales compuestos del aceite de cedrón se encuentran limoneno, linalool, cidral entre otros. El cedrón ha sido empleado comúnmente en infusiones conocido por ser antiespasmódico, antipirético, sedativo y digestivo. Se ha usado comúnmente para tratar el asma, flatulencias, cólicos, diarrea, indigestión. Las concentraciones de los compuestos de la planta, varían según las condiciones de cultivo y climatológicas: limoneno 0.6-37 %, neral 11-30%, geranial 14-37%.

#### Principales compuestos de *Lippia citriodora*

Limóneno	Citral :Neral y geranial
	

De acuerdo con la recopilación anterior se seleccionaron las plantas con propiedades desinflamatorias, antibióticas y de uso etnobotánico dérmico. Entre ellas la: *Lippia origanoides*, *Thymus vulgaris*, *Lippia citriodora*, *Guazuma* y *Achyrocline bogotensis*, para iniciar los procedimientos experimentales teniendo en cuenta el siguiente juicio de valor tabla 2:

**TABLA 2 CRITERIOS SELECCIÓN PLANTAS**

Planta	Distribución geográfica	Propiedades desinflamatorias	Antibióticas	Dérmico-Abscesos
<b><i>Lippia organoides</i></b> Familia Lamiaceae	Nativa /Andina	X	X	X
tomillo <b><i>Thymus vulgaris</i></b> Familia Lamiaceae	Nativa de Europa; cultivada en América	X	X	X
Guásimo <b><i>Guazuma ulmifolia</i></b> Familia Malvaceae	Nativa/ Andina	X	X	X
Vira- Vira <b><i>Achyrocline bogotensis</i></b> Familia Asterácea	Nativa /Andina	X	X	X
<b><i>Lippia citriodora</i></b>	Introducida cultivada en América	X	X	X

## 3 OBJETIVO E HIPÓTESIS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar aceites esenciales como agentes antimicrobianos para la prevención y control de la mastitis en bovinos.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de aislados de mastitis en bovinos de la sabana de Bogotá frente a aceites esenciales y antibióticos convencionales.
- Evaluar posibles efectos potenciadores en la actividad antimicrobiana *in vitro* de la mezcla de aceites esenciales.
- Realizar un ensayo *in vivo* para evaluar la viabilidad en la prevención y tratamiento de mastitis en bovinos de la sabana de Bogotá con el uso de aceites esenciales.

### 3.3 HIPÓTESIS PLANTEADA

Ho: Los aceites esenciales evaluados son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos predominantes de la mastitis en bovinos y son una posible estrategia para su prevención.

H1 Los aceites esenciales evaluados no son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos predominantes de la mastitis en bovinos y no son una posible estrategia para su prevención.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder evaluar los aceites esenciales / extractos de las plantas seleccionadas como posibles agentes para la prevención y/o control de la mastitis en el departamento de Cundinamarca – Colombia, se plantea una investigación de tres fases (figura 3).

La primera fase exploratoria se enfoca en la extracción de los aceites esenciales y en la caracterización química para garantizar que los metabolitos con capacidad antimicrobiana estén presentes y evaluar su posible actividad citotóxica, esta corresponde a fase preliminar.

Una segunda fase, *in vitro*, en la cual se desarrollan los experimentos con microorganismos patógenos aislados de casos positivos de mastitis bovina en la región de estudio. En esta fase se evalúa la actividad antimicrobiana, se valora si la mezcla de los aceites potencia la actividad antimicrobiana y se determina la concentración mínima inhibitoria y bactericida para dar paso a una posible formulación y realizar la fase *in vivo*. Los ensayo en animales se realizarán en la región de la “sabana de Bogotá”, evaluando una formulación preliminar de sellador de barrera a base de aceites esenciales en comparación con un producto comercial.

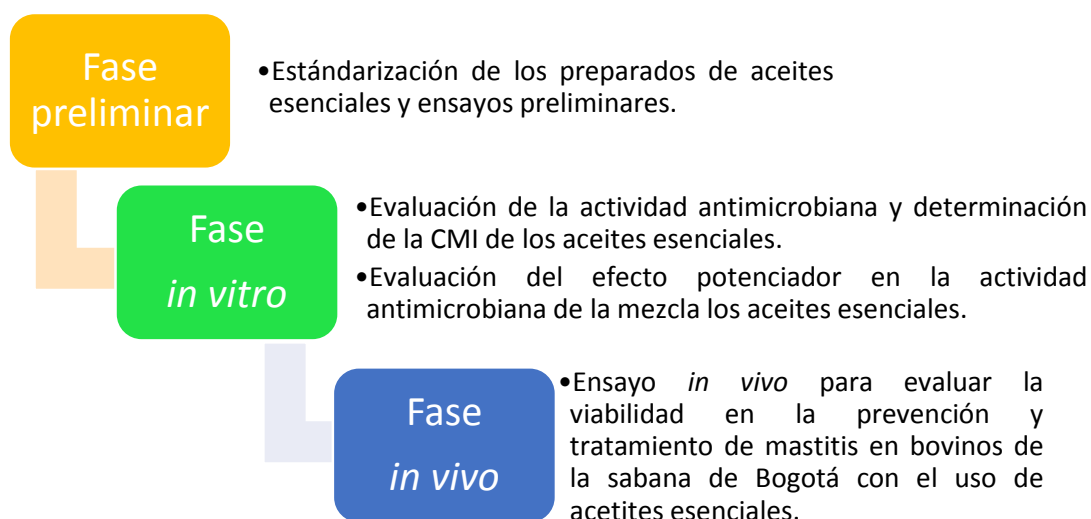


FIGURA 3 METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Los estudios experimentales de las primeras dos fases, se llevarán a cabo empleando cepas aisladas procedentes de bovinos con mastitis de la sabana de Bogotá en el laboratorio de microbiología de la facultad de veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia elegidas aquellas consideradas de mayor incidencia e interés patogénico.

La fase *in vivo* se realizará con la Asociación de productores de leche de Chocontá, en hatos lecheros de la sabana de Bogotá.

Las técnicas y procedimientos empleados en cada fase serán descritas en cada uno de los experimentos.

#### 4.1 FASE PRELIMINAR

Previa revisión de la bibliografía y recopilación de los saberes ancestrales de la región para el tratamiento de la mastitis, se seleccionaron las plantas medicinales que se incluirán en el estudio, a partir de esto se realizará la estandarización del método de extracción ya sea con solvente o arrastre por vapor y se caracterizarán la composición. Posteriormente, se realizarán los ensayos preliminares de carga microbiana que pueda estar presente en el aceite esencial extraído y citotoxicidad.

#### 4.2 FASE *In vitro*

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se emplearán los métodos de determinación de concentración mínima inhibitoria por micro dilución en placa y difusión de discos Kirby-Bauer, igualmente, se emplearán las normas estandarizadas del NCCLS para determinar los rangos si un microorganismo es sensible, resistente o con sensibilidad intermedia frente a cada antibiótico de estudio.

El tamaño de la muestra se analiza través de la Calculadora de *Grandària Mostral GRANMO Versió 7.12* con un nivel de confianza 0.95. Para el análisis estadístico se empleará las categorías de sensible y no sensible frente a los antibióticos considerando que para fines terapéuticos los antimicrobianos con resistencia intermedia no se aconsejan en el tratamiento.

Se utilizará la prueba de Chi cuadrada ( $X^2$ ) y se considerará diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ , el análisis de datos se realizará mediante el paquete estadístico SPSS para valorar la tendencia de proporciones y concordancias.

### 4.3 FASE *In vivo*

Se realizará un ensayo piloto a fin de evaluar la viabilidad del uso de aceites esenciales en la prevención y tratamiento de la mastitis evaluando los siguientes parámetros: Recuento de células somáticas por microscopía directa, test de california y cultivo microbiológico.

El tamaño de la muestra se analiza través de la Calculadora de *Grandària Mostral GRANMO Versió 7.12* con un nivel de confianza 0.95. Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral. Se considerará diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ , el análisis de datos se realizará mediante el paquete estadístico SPSS.



## 5 FASE PRELIMINAR: EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CITOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

Las plantas incluidas en el estudio fueron obtenidas de cultivos jóvenes del municipio de Machetá a una altura de 1850 msnm, clima templado a cálido con temperatura promedio anual de 17.8 C, con mínimas de temperatura de 12 C y máximas de 24 C.

Lo que facilita el cultivo de plantas aromáticas especialmente de la familia de las Lamiaceae. Considerando que algunas especies son nativas de Colombia, el material vegetal fue identificado en el Herbario Nacional Colombiano ubicado en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. Los aceites esenciales de las especies *Lippia origanoides*, *Lippia citriodora* y *Thymus vulgaris* fueron obtenidos por destilación por arrastre de vapor, por ser un proceso de fácil manejo, económico y de buen rendimiento. Para optimizar la extracción se consideraron pre-tratamientos del material vegetal para incrementar la superficie de contacto y por tanto, se disminuyó el tamaño de partícula para contribuir a la extracción, dada la calidad del material vegetal se optó por el pre-tratamiento de secado y fragmentado, descrito a continuación: El material vegetal es secado parcialmente al sol, protegido de la luz ultravioleta directa que puede producir reacciones químicas que destruyen o evaporan los metabolitos de interés. Se seca en un lugar cubierto con aireación constante. El tiempo de secado depende de la planta y la aireación recibida durante el proceso, la temperatura y humedad del aire, generalmente es cercano a los ocho días. Este proceso se puede realizarse en manojos atados al techo o en marcos de madera 1,20 m \* 1,20 m, con malla interna de metal, de plástico o de hilo. Sujetándoles con una estructura de madera, se los apila a una distancia de 20 cm lo que permitiría un secado más rápido; hasta alcanzar una humedad cercana al 12%.

El sistema de destilación por arrastre de vapor se realizó en un alambique tradicional de cobre como se muestra en la figura 4. En la sección A del sistema, hay depósito de agua que sirve como caldera y suministra el vapor a la sección E, que es la columna de destilación en la cual se deposita el material vegetal previamente secado. La función del vapor es hacer un arrastre de los metabolitos secundarios. El vapor y los metabolitos extraídos llegan al condensador (sección G). Ya en forma líquida se separa el aceite esencial y el hidrolato por la diferencia de densidades, quedando en la parte superior el aceite esencial.

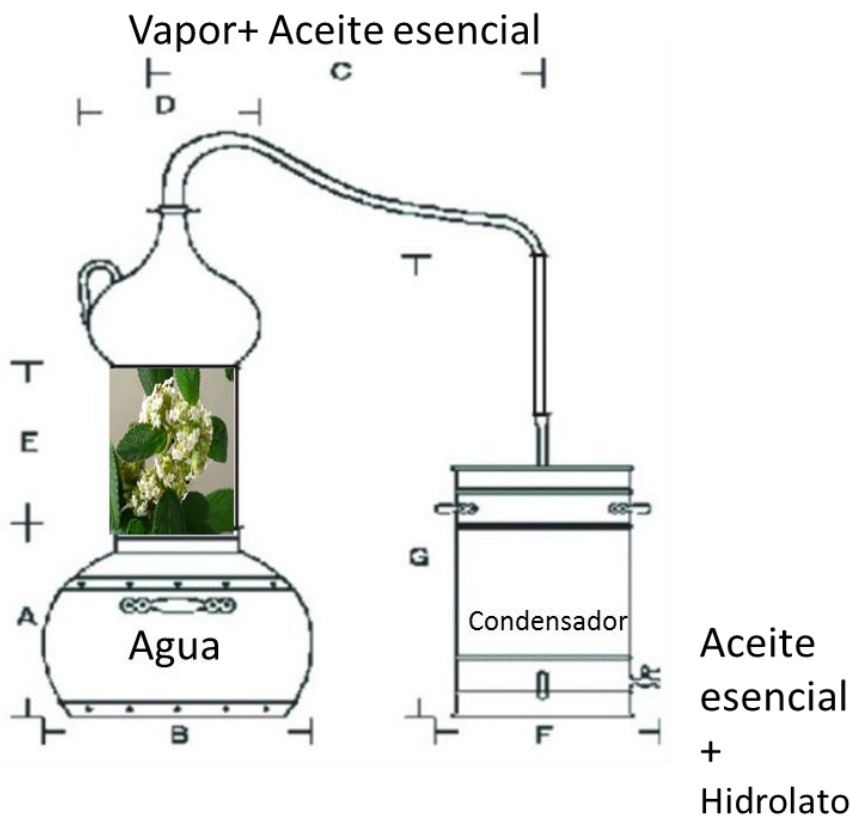


FIGURA 4 SISTEMA DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

Fuente: Modificado de Cobrelis, 2019

Los aceites esenciales obtenidos fueron almacenados a 4°C en un recipiente de vidrio color ámbar, hasta el análisis cromatográfico para identificar sus principales metabolitos.

## 5.1 DETERMINACIÓN DE COMPONENTES EN LOS ACEITES ESENCIALES

El análisis de los aceites esenciales se desarrolló de acuerdo al método ISO17025:2005 por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). La muestra fue diluida e inyectada directamente al equipo cromatográfico en modo Split  $V_{iny}=2\mu\text{L}$ . El equipo empleado es un cromatógrafo de gases AT 6890 Series Plus acoplado a un **DETECTOR DE MASAS MSD 5975, CON UNA COLUMNA DE ANÁLISIS DB-5MS.**

La identificación de los compuestos de los aceites esenciales se realizó de acuerdo a sus espectros de masas y la base de datos de Adams, Wiley y NIST. En las Tablas 3, 4 y 5 se relacionan los tiempo de retención, cantidad relativa y compuestos más representativos presentes en los aceites esenciales de *Lippia citriodora*, *Thymus vulgaris* y *Lippia origanoides*, respectivamente.

Dentro de los principales componentes del aceite esencial de *Lippia citriodora*, se encuentra el limoneno, el geranial y neral. Jareerat et al. (2011) reporta que la mezcla de estos metabolitos generan daños en la membrana citoplasmática en *Staphylococcus aureus* - Meticillina resistente, respaldando los usos tradicionales en la región como antimicrobiano.

**TABLA 3 COMPUESTOS ACEITE ESENCIAL DE *Lippia citriodora***

<b>T<sub>R</sub> min</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa %</b>
<b>15.33</b>	$\alpha$ -pineno	0.7
<b>17.33</b>	$\beta$ -pineno	2.9
<b>19.38</b>	$\rho$ -Cimeno	1.9

<b>T<sub>R</sub> min</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa %</b>
<b>19.75</b>	Limoneno	38.6
<b>20.75</b>	Y-Terpineno	2.3
<b>26.24</b>	α-terpineol	0.7
<b>27.90</b>	Neral	21.6
<b>28.96</b>	Geranial	24.8

En los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Lippia origanoides*, se encuentra como principal componente el timol y el carvacrol, ambos asociados con la actividad antimicrobiana, antioxidantes y capaces de inhibir la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias de bovinos.

**TABLA 4** COMPUESTOS ACEITE ESENCIAL *Thymus vulgaris*

<b>T<sub>R</sub> min</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa %</b>
<b>17.76</b>	β-mirceno	1.6
<b>19.81</b>	Limoneno	24.2
<b>22.4</b>	Linalool	0.8
<b>29.69</b>	Timol	29,0
<b>29.94</b>	Carvacrol	14.0

**TABLA 5** COMPUESTOS ACEITE ESENCIAL *Lippia origanoides*

<b>T<sub>R</sub> min</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa %</b>
<b>11.81</b>	o -cimeno	0.8
<b>21.42</b>	Durenol	3.5
<b>29.75</b>	Timol	59.3

## 5.2 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

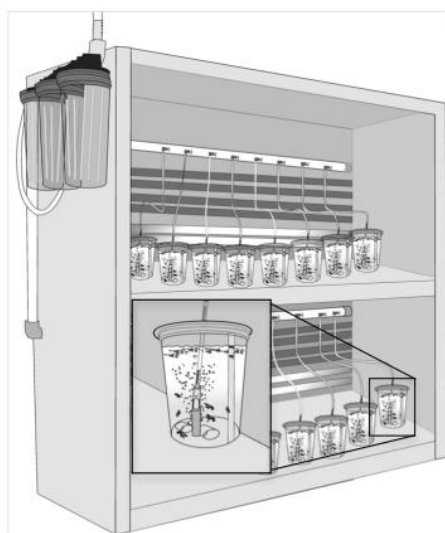
Para evaluar la citotoxicidad de los aceites esenciales se realizó el bioensayo de *Artemia franciscana*, método descrito por Meyer et al. (1982), usado para la investigación de productos naturales, a fin de encontrar la concentración letal CL<sub>50</sub> en µg/mL para los

aceites esenciales de *Lippia citriodora*, *Thymus vulgaris* y *Lippia origanoides*. La *Artemia franciscana*, es un crustáceo perteneciente a la familia de *Anostraca*, distribuida y adaptada en agua salada en todo el mundo.

Los huevos fueron eclosionados en agua salada artificial a 26°C y oxigenación constante después de 48 h. El bioensayo consistió en la preparación de 6 soluciones salinas de aceites esenciales a concentraciones de 33.7, 16.8, 8.42 y 4.21 µg/mL disueltos en 20µL DMSO (Dimetil sulfóxido). Se empleó como control negativo una solución salina de DMSO al 0.02% (20µL/100 mL agua salina) y una solución salina pura.

Preparadas las soluciones se sirvieron en recipientes 6 ml de cada solución por triplicado y se colocaron 10 metanauplios de *Artemia franciscana* (Figura 5). Posterior a 24 h a las mismas condiciones iniciales para la eclosión (temperatura y oxígeno), se contaron los metanauplios vivos (con movimiento) y se procedió al análisis estadístico (GONZÁLEZ, 2010).

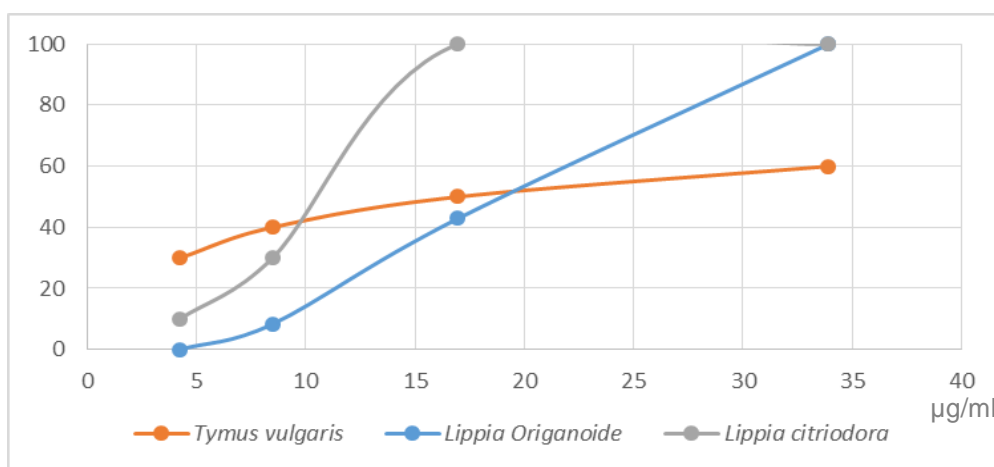
**FIGURA 5 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON *Artemia***



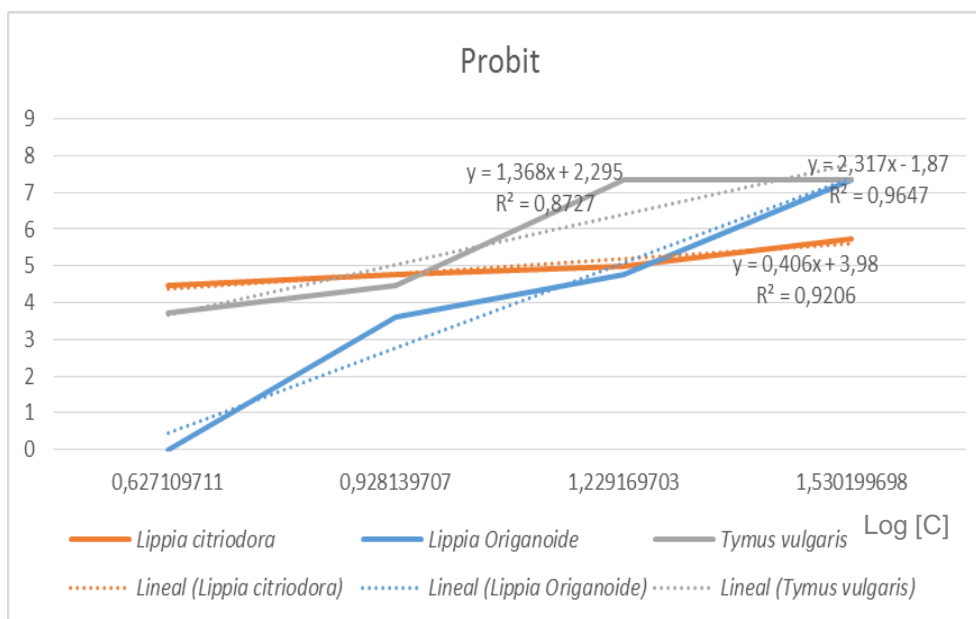
Fuente: González, 2010

Los efectos tóxicos fueron registrados en proporción a la concentración con una correlación de R: 96.4% para *L. origanoides*, 92,1% para *L. citriodora* y 87.3% para *Thymus vulgaris*, a 24 h. En las figuras 6 y 7 se puede observar la mortalidad vs concentración de aceite esencial y la regresión estadística con el modelo Probit para determinar la concentración letal 50.

**FIGURA 6 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ACEITE ESENCIAL SOBRE LA MORTALIDAD DE ARTEMIA (% MORTALIDAD VS CONCENTRACIÓN [C] µg/ml)**



**FIGURA 7 REGRESIÓN ESTADÍSTICA CON EL MODELO PROBIT DE LOS ACEITES ESENCIALES**



De acuerdo con lo anterior, la CL<sub>50</sub> de los aceites esenciales y la confiabilidad de esta estimación se muestran en la Tabla 6, así como la CL<sub>50</sub> de algunos agentes antimicrobianos de referencia. Se puede observar la baja citotoxicidad del aceite esencial de *Lippia origanoides*, en relación a los otros aceites, esto evidencia su capacidad y potencial (Pérez & Lazo, 2010). De otra parte, la citotoxicidad de los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Thymus vulgaris* similar a agentes fúngicos como el Itraconazol, y mucho menos citotóxico que agentes antimicrobianos de productos comerciales como el Triclosan. Aunque el valor esté muy por encima de antibióticos como la Oxitetraciclina, que se emplea en el tratamiento de infecciones comunes en bovinos a dosis de 10-20 mg/ Kg peso vivo.

**TABLA 6 CL<sub>50</sub> ACEITES ESENCIALES Y AGENTES ANTIMICROBIANOS DE REFERENCIA**

Aceite esencial o sustancia química	CL <sub>50</sub> µg/ml a 24h	Nivel de confianza
<b>AE. <i>Lippia origanoides</i></b>	19,39	96,4%
<b>AE. <i>Lippia citriodora</i></b>	10,05	92,1%
<b>AE. <i>Thymus vulgaris</i></b>	16,95	87,3%
Agente antimicrobiano	CL <sub>50</sub> µg/ml a 24h	Fuente
<b>Ketoconazol (dosis perros 10 mg/kg*d)</b>	38.5	(Iannacone, Alvariño, Valle Riestra, Ymaña, & Argota, 2016)
<b>Clotrimazol(2.31mg/d)</b>	37.1	
<b>Triclosan (0.3%)</b>	1.34	
<b>Itraconazol</b>	19.8	
<b>Oxitetraciclina (dosis bovinos 10-20 mg/ Kg peso vivo)</b>	923	
<b>DMSO</b>	8.5%	(Geethaa, Thavamany, Chiew, & Thong, 2013)

## 6 FASE *IN VITRO*. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES Y ANTIBIÓTICOS SOBRE MICROORGANISMO DE IMPORTANCIA EN MASTITIS BOVINA

Este ensayo evaluó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y antibióticos convencionales frente a cepas *Staphylococcus spp* de aisladas de casos clínicos de mastitis bovina en la sabana de Bogotá y evaluar las diferencias significativas en el crecimiento de estas cepas frente a los antimicrobianos más comunes. La sensibilidad de las cepas aisladas de *Staphylococcus spp* (n=80) fue evaluada frente a los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (L), *Lippia Alba* (Mill) y *Lippia citriodora* (L'He'r.), así como a los antibióticos Oxacilina, Gentamicina, Clindamicina, Cloranfenicol, Amoxicilina, Enrofloxacino y Eritromicina a través del método de *Kirby-Bauer*. Para el análisis estadístico se calculó el tamaño de la muestra con GRANMO 7.12 y el paquete estadístico IBM SPSS.

### 6.1 Aislamiento de microorganismos patógenos

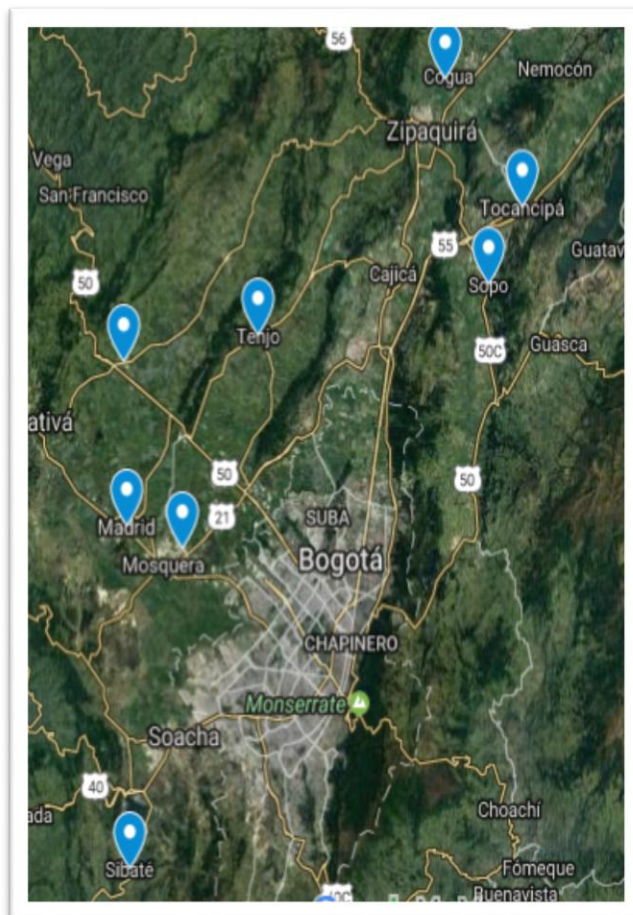
Considerando que la sabana de Bogotá es una de las regiones geográficas más relevantes para este sector productivo, en el departamento de Cundinamarca se producen entre 15.000 a 100.000 litros diarios por empresa<sup>3</sup>. Dada su importancia comercial y la prevalencia de mastitis presentada en esta zona se seleccionaron de 8 municipios de Cundinamarca, aledaños a la ciudad de Bogotá (figura 8) para delimitar el muestreo.

---

<sup>3</sup> FEDEGAN 2017

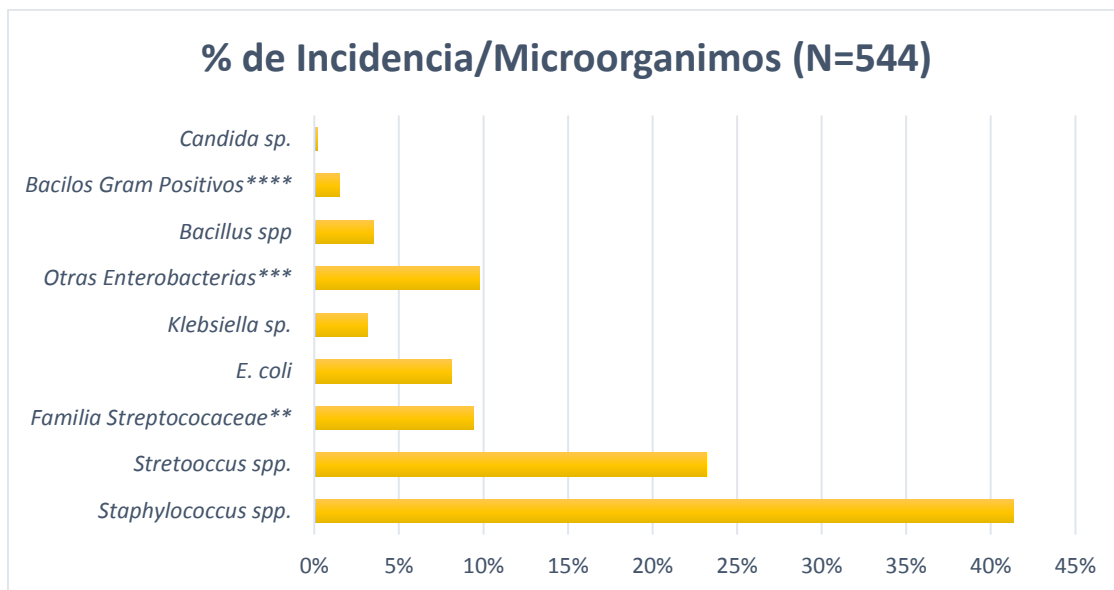


En total se analizaron N= 544 casos de los cuales se encontró mayor porcentaje de incidencia para las cepas de *Staphylococcus spp* en las muestras positivas de mastitis, figura 9. Considerando su recurrencia en los casos analizados de mastitis en las vacas de los hatos lecheros y la falta de higiene que se lleva a cabo en las prácticas de extracción de la zona, las cepas de *Staphylococcus spp.* y en especial el *Staphylococcus aureus* representa un mayor interés como principal causante de la mastitis clínica crónica, casos de reincidencia y contaminación de vacas sanas (Pozzo, Santurio, Rossatto, Vargas, & Alves, 2011).



Municipio	Porcentaje
Cogua	28%
El rosal	5%
Funza	10%
Madrid	3%
Sibaté	8%
Sopo	10%
Tenjo	15%
Tocancipá	23%

**FIGURA 8 DELIMITACIÓN ZONA / PORCENTAJE PARTICIPACIÓN DE MUESTREO**



**FIGURA 9 INCIDENCIA POR MICROORGANISMOS EN CASOS POSITIVOS MASTITIS BOVINA**

Se aislaron 80 cepas de *Staphylococcus spp.*, las cuales se le realizaron las siguientes pruebas de identificación: Tinción Gram, Catalasa, Coagulasa, Manitol, DNAsa, Voges-Proskauer, Baird Parke y Maltosa. Específicamente se identificaron 37 cepas de *Staphylococcus aureus*.

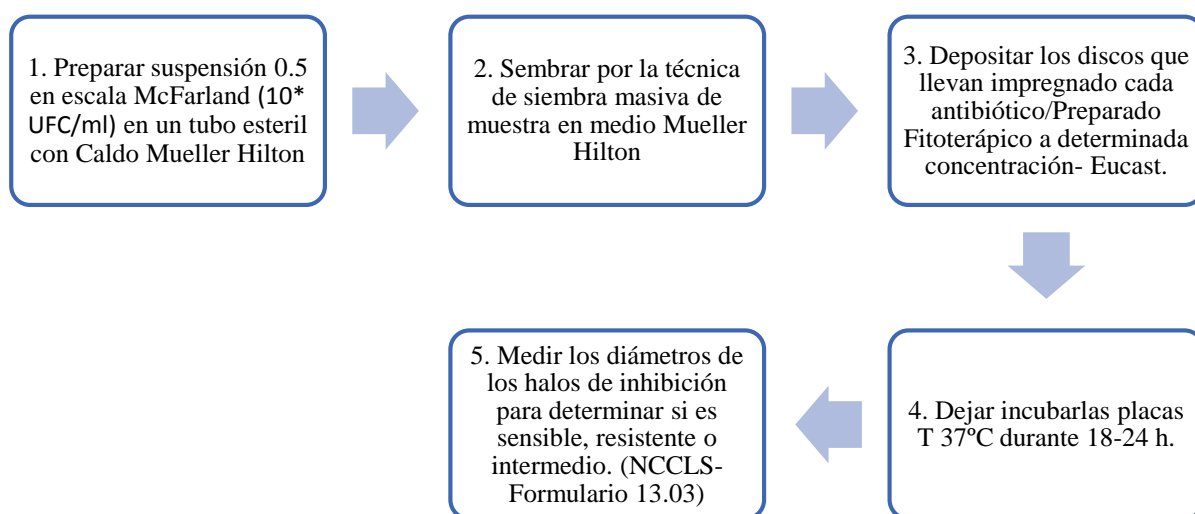
De acuerdo con los tamaños de la muestra para una población infinita de cepas se calculó con el programa Granmo 7.12 las unidades de precisión que se puede evaluar en la sensibilidad *in vitro* de los antibióticos con un nivel de confianza expresado en la Tabla 7.

**TABLA 7 ANÁLISIS TAMAÑO DE LA MUESTRA: PROGRAMA GRANMO 2015**

Microorganismo	Nivel de Confianza	Unidades de precisión
<i>Staphylococcus spp</i> (n=80)	95	+/- 11
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=37)	95	+/- 16

## 6.2 Técnica de difusión en disco Kirby Bauer

Para evaluar la susceptibilidad en los antibiogramas para las cepas de estudio se realizó la técnica de difusión con discos de *Kirby Bauer* descrita en la figura 10:



**FIGURA 10 TÉCNICA DE DIFUSIÓN KIRBY BAUER**

Fuente: (Bernal & Guzman, 1984)

## 6.3 Productos naturales evaluados

Los productos naturales se evaluaron impregnando discos de 7 mm de papel filtro estéril (densidad 140g/cm<sup>2</sup>), con 20 µL (Fratini, y otros, 2014) de:

1. Aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*)
2. Aceite esencia de pronto alivio (*Lippia Alba*) (en el momento de este estudio no se contaba con cultivos de la planta *Lippia origanoides*, por

disponibilidad y de acuerdo a las revisiones bibliográficas fue reemplazada por esta variedad).

3. Aceite esencial de Cedrón (*Lippia citriodora*)
4. Resina guácimo (*Guazuma ulmifolia*) decocción
5. Resina guácimo maceración e infusión.
6. Resina Vira vira (*Achyrocline bogotensis*) decocción
7. Resina Vira vira maceración e infusión.

Adicionalmente, se evaluaron los siguientes antibióticos convencionales: Oxacilina, Gentamicina, Clindamicina, Cloranfenicol, Amoxicilina, Enrofloxacino y Eritromicina.

En la incubación el disco de antibiótico difunde radialmente en el agar su concentración que va disminuyendo a medida que se aleja del disco, hasta que su concentración no puede inhibir el crecimiento del microorganismo en estudio. Dependiendo del tamaño de este diámetro el antibiótico puede ser clasificado como sensible, intermedio o resistente (S, I, o R). De otro lado, se emplearon las categorías de cepas sensible y resistente frente a los antibióticos, considerando que para fines terapéuticos, los antimicrobianos con resistencia intermedia no se aconsejan en el tratamiento.

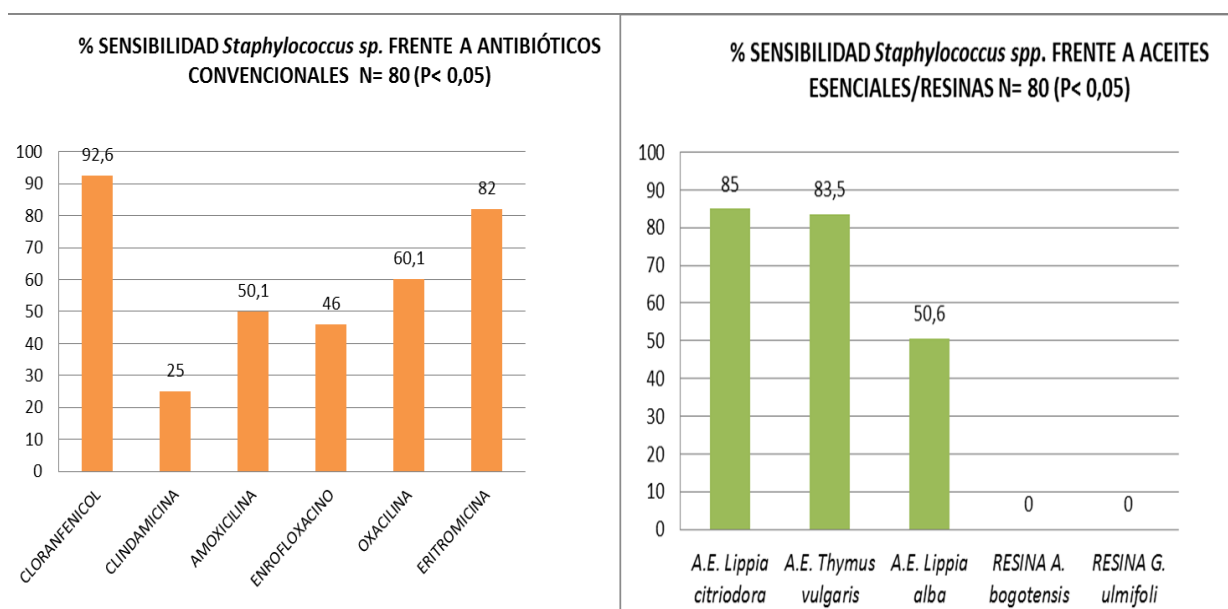
Para el caso de los productos naturales, se midió el diámetro de inhibición de crecimiento frente a los aceites esenciales y las resinas y se calcularon la estadística descriptiva: mínimo, máximo, media y error estándar (Tabla 8). A partir de estos valores se definió una sensibilidad para discos mayores de 20 mm y resistencia para discos menores a este valor (Fratini, y otros, 2014). Se utilizó la prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) y se consideró una diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ .

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS para valorar la tendencia de proporciones y concordancias.

**TABLA 8 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA PRODUCTOS NATURALES**

	<b>Media Estadístico</b>	<b>Error estándar</b>
1. Aceite esencial de cidrón ( <i>Lippia citriodora</i> )	<b>27,2</b>	<b>0,91</b>
2. Aceite esencia de pronto alivio ( <i>Lippia alba</i> )	<b>21,3</b>	<b>1,30</b>
3. Aceite esencial de tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	<b>26,7</b>	<b>0,83</b>
4. Resina guácimo ( <i>Guazuma ulmifolia</i> ) decocción	<b>5,1</b>	<b>1,55</b>
5. Resina guácimo maceración e infusión.	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
6. Resina Vira vira ( <i>Achyrocline bogotensis</i> ) decocción	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
7. Resina Vira vira maceración e infusión.	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

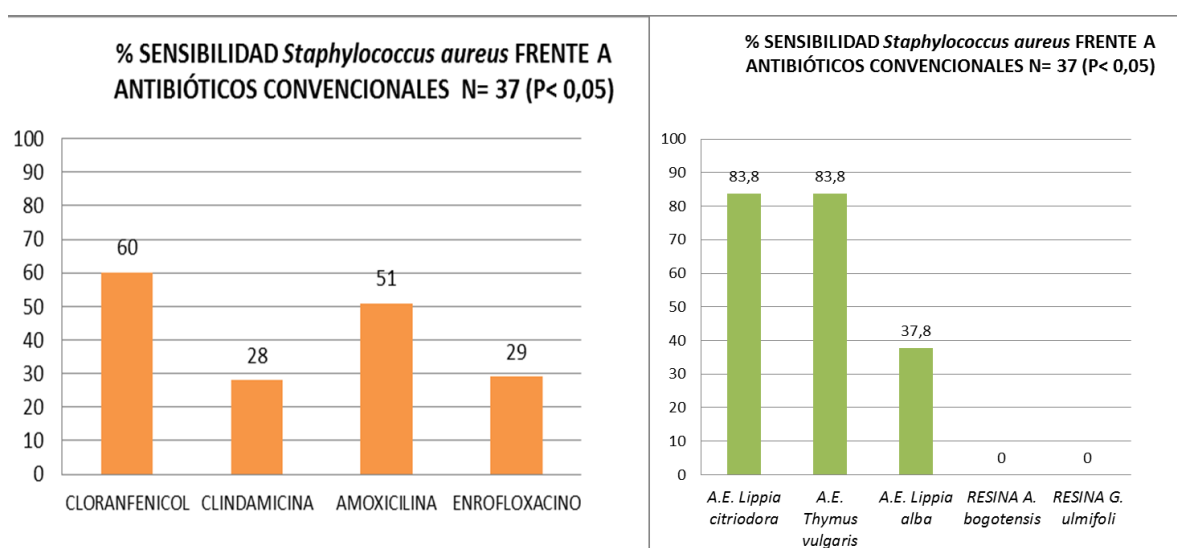
Los aceites esenciales evaluados presentaron actividad antimicrobiana con los siguientes porcentajes de inhibición de cepas de *Staphylococcus spp.*: *Lippia citriodora* (85%), *Thymus vulgaris* (83.5%) y *Lippia alba* (50.6%) (Figura 11).



**FIGURA 11 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PLANTAS VS ANTIBIÓTICOS N=80**

La mayor sensibilidad se presentó frente al Cloranfenicol con un 92.6% de cepas sensibles, mientras que el antibiótico en el que se presentó mayor resistencia fue la Clindamicina con una sensibilidad solo en el 25% de las cepas evaluadas. Para los demás antibióticos la sensibilidad no fue concluyente: Amoxicilina con un 50.1%, Enrofloxacino con un 46% y Oxacilina con un 60.1% en cepas de *Staphylococcus spp.* ( $p < 0.05$ )

Un comportamiento similar se observó en los aislados de *Staphylococcus aureus* como se observa en la figura 12, sin embargo, se observó mayor resistencia frente a los antibióticos convencionales y se mantuvo la sensibilidad presentada frente a *Lippia citriodora* (83.8%) y *Thymus vulgaris* (83,8%).



**FIGURA 12** SENSIBILIDAD FRENTE ANTIBIÓTICOS Y ACEITES ESENCIALES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* N=37

Se evidencia que existen diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas frente a los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y

*Thymus vulgaris* mostrando una actividad antimicrobiana ( $p < 0.05$ ), así como una sensibilidad de estas cepas frente al Cloranfenicol y una resistencia a la Clindamicina ( $p < 0.05$ ). El *Staphylococcus aureus* presenta mayor resistencia frente a los antibióticos convencionales sin embargo mantiene la sensibilidad frente a los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Thymus vulgaris*.

## 7 FASE *IN VITRO*. EFECTO SINÉRGICO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES EN LA MASTITIS BOVINA

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (L) y *Lippia citriodora* (L'He'r.) han mostrado actividad antimicrobiana en ensayos *in vitro* en cepas aisladas de *Staphylococcus spp* (n=80) provenientes de casos positivos para mastitis bovina de la sabana de Bogotá – Colombia, siendo una posible alternativa terapéutica. El presente ensayo evalúa el efecto sinérgico/potenciador de la mezcla de estos dos aceites esenciales frente a los aislamientos y busca encontrar diferencias significativas en su crecimiento respecto a los aceites esenciales puros.

La sensibilidad de las cepas aisladas de *Staphylococcus spp* fue evaluada frente a mezclas de distintas concentraciones de aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (L) (AET) y *Lippia citriodora* (L'He'r.) (AEC), utilizando la técnica del tablero de ajedrez y el método de *Kirby-Bauer*. Se concluye que existen efecto sinérgico de la mezcla de aceites esenciales (75% AEC /25% AET) que potencia su actividad antimicrobiana optimizando su eficiencia terapéutica ( $p < 0.05$ ). La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CBM) de la mezcla (75% AEC /25% AET) fue determinada por la técnica de micro dilución en caldo (n=80).

### 7.1 Microorganismos

A partir de 80 cepas aisladas de *Staphylococcus spp*, de casos positivos de mastitis bovina de la sabana de Bogotá previamente caracterizados en el Laboratorio de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá (n=43 Coagulasa negativo y n=37 *Staphylococcus aureus*), almacenados en condiciones de congelación. Se realizó el cultivo previa descongelación y cultivo en agar sangre incubados a 37 °C 24 horas para la ejecución de las pruebas.



## 7.2 Aceites esenciales y elaboración de la mezcla

El aceite esencial de *Lippia citriodora* (L'He'r.) (AEC) previamente caracterizado, principalmente compuesto de limoneno, citral y linalool, no contiene ingredientes peligrosos y puede emplearse en preparaciones cosméticas emolientes. Es un aceite transparente amarillo pálido de densidad  $d_{20}$  0.86 g/mL, insoluble en agua y soluble en aceites vegetales. Previamente había mostrado un 85% de inhibición en las cepas de estudio, con un halo medio de 27,2 mm.

Igualmente se evaluó el aceite de *Thymus vulgaris* (L) (ACT) que está compuesto principalmente por de timol y cimeno, trazas de borneol, acetato de bornilo. La densidad  $d_{20}$  0.88 g/mL. insoluble en agua, soluble en aceites y solventes orgánicos. Previamente había mostrado un 82,5% de inhibición en las cepas de estudio, con un halo medio de 26,7 mm.

Se utilizó como disolvente miristato de isopropilo estéril, que ha demostrado no tener actividad antimicrobiana en las condiciones de ensayo, con  $d_{20}$  0.856 g/mL, empleado como excipiente en ensayos de esterilidad y en productos cosméticos a base de aceites y grasas<sup>4</sup>.

Estudios demuestran que existe sinergia en la actividad antimicrobiana de plantas medicinales (Mundy, Pendry, & Rahman, 2016). Por lo anterior, se empleó la técnica de tablero de ajedrez, que se usa en el estudio de actividad combinada, en la cual hay múltiples diluciones de los antimicrobianos en concentraciones superiores e inferiores a la Concentración Mínima Inhibitoria -CMI reportada para estos aceites (Picazo, 2000). Se trabajó con concentraciones mucho mayores considerando que la calidad de los

---

<sup>4</sup> British Pharmacopoeia 2009. British Pharmacopoeia Volume I & II. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances: Isopropyl Myristate

aceites empleados en el estudio es inferior a lo descrito en la farmacopea británica<sup>1</sup> para el aceite esencial de tomillo. De esta forma, quedan representadas todas las posibles combinaciones de diluciones para los dos aceites esenciales de estudio en 19 mezclas descritas en la tabla a continuación.

**TABLA 9 TABLERO CONCENTRACIONES AET/AEC**

% Aceite esencial de <i>Lippia Citriodo</i>	% Aceite esencial de <i>Tymus vulgaris</i>				
	0%	3%	6%	25%	50%
0%	1	2	3	4	5
3%	6	7	8	9	10
6%	11	12	13	14	15
25%	16	17	18	19	20
50%	21	22	23	24	25
75%	26	27	28	29	

Para la técnica de Kirby Bauer se prepararon los discos con las mezclas a evaluar impregnando discos de 7 mm de papel filtro estéril (densidad 140g/cm<sup>2</sup>), con 20 µL de mezcla (Fratini et al, 2014).

Se inocularon las placas de Muller –Hilton con una solución de caldo Muller Hilton a una escala de turbidez 0.5 McFarland, se colocaron los discos previamente preparados y se incubó durante 24 horas a 37 °C, posteriormente, se midió los halos de inhibición de las placas en mm. <sup>5</sup>

---

<sup>5</sup> Método actividad antimicrobiana. Pruebas biológicas. Actividad antimicrobiana. Farmacopea de los Estados Unidos.2010

### 7.3 Análisis estadístico

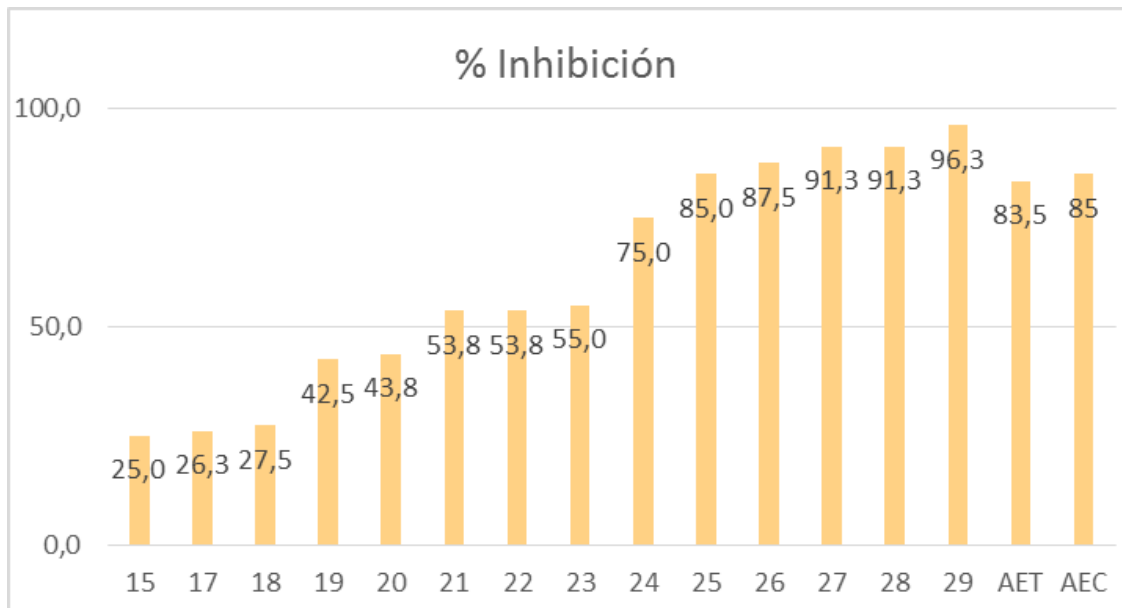
Para el análisis estadístico se calculó el tamaño de la muestra con GRANMO 7.12 y el paquete estadístico IBM SPSS, se utilizó la prueba de Mann Whitney para grupos no paramétricos independientes.

En el ensayo preliminar se evaluó la actividad antimicrobiana con el método de difusión de disco y micro dilución a fin de descartar aquellas mezclas no relevantes para el ensayo. Se descartaron 15 mezclas las cuales se muestran sombreadas en la Tabla 10, quedando 14 mezclas a evaluar una posible sinergia significativa:

**TABLA 10 MEZCLAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (SIN ACTIVIDAD  )**

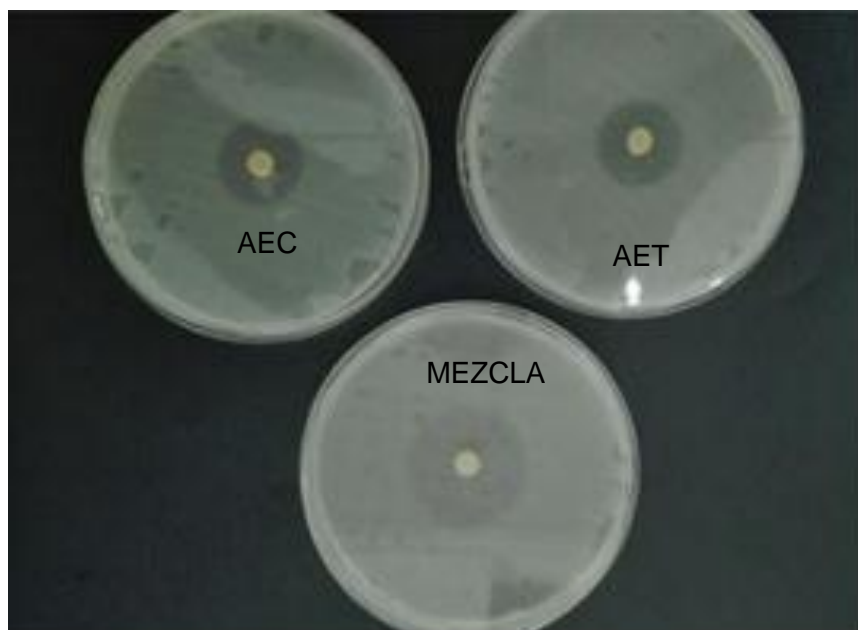
<b>AET AEC</b>	<b>0%</b>	<b>3%</b>	<b>6%</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>
<b>0%</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>3%</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>6%</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>25%</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>50%</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>
<b>75%</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	

Las mezclas que presentaron actividad antimicrobiana fueron evaluadas con el total de aislamientos (n=80), figura 13, mediante el método de difusión de disco encontrando que únicamente 6 de las mezclas mostraban una actividad antimicrobiana relevante (24-29).



**FIGURA 13 INHIBICIÓN PARA LAS MEZCLAS EVALUADAS**

Se midieron los halos de inhibición para el total de aislados (n=80) y se calculó la media (Tabla 11), también se observó un incremento en los halos de inhibición a partir de la mezcla 24 como lo muestra la figura 14.



**FIGURA 14 INCREMENTO HALOS INHIBICIÓN**

**TABLA 11 HALO INHIBICIÓN EXPRESADO EN mm**

<i>Mezcla</i>	<i>Halo mm</i>	<i>Mezcla</i>	<i>Halo mm</i>
15	11,05	24	29,12
17	10,22	25	31,02
18	16,06	26	31,05
19	17,3	27	32,36
20	18,54	28	33,47
21	23,5	29	34,55
22	25,81	AET	26,6
23	26,56	AEC	27,2

El tamaño de la muestra fue calculado para dos grupos independientes teniendo en cuenta la máxima diferencia de porcentajes presentada, es decir la mezcla 29 con un porcentaje de 96.25% para el grupo 1 y 83,5% grupo 2 Aceite esencial de tomillo, y estimando ninguna pérdida se requieren 79 individuos para representar la población. Considerando la n=80, el análisis estadístico y la evaluación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida se realiza con la mezcla 29 (75 AEC/25AET).

El análisis estadístico se realiza con el programa SPSS; para variables no paramétricas con la prueba de Mann –Whitney, aceptando diferencia significativa en las medias de los halos de inhibición de la mezcla comparada con el aceite esencial de cedrón puro y el aceite esencial de tomillo con un  $p < 0.05$ :

**TABLA 12 PRUEBA DE MANN-WHITNEY**

<b>Estadísticos de prueba<sup>a</sup></b>	
	VAR00002
U de Mann-Whitney	1518,000
W de Wilcoxon	4758,000
Z	-5,895
Sig. asintótica (bilateral)	,000

a. Variable de agrupación: VAR00001

Frente a ambos aceites puros el p valor es  $<0.05$ , mostrando una diferencia significativa en la actividad antimicrobiana de la mezcla frente a los microorganismos aislados de estudio.

Se evidencia que existen efecto sinérgico de la mezcla de aceites esenciales (75% AEC /25% AET) que potencia su actividad antimicrobiana optimizando su eficiencia terapéutica ( $p < 0.05$ ), con un halo medio de inhibición de 34 mm y un porcentaje de inhibición del 96%, por encima del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (L) halo medio de 26 mm y 83% de porcentaje de inhibición y del aceite esencial de *Lippia citriodora* (L'He'r.) con un halo medio de 27 mm y 85 % de porcentaje de inhibición.

## **8 FASE *IN VITRO*. SCREENING DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A *Staphylococcus aureus* OXACILINA RESISTENTE AISLADOS DE CASOS CLÍNICOS DE MASTITIS BOVINA**

El *Staphylococcus aureus* Oxacilina-resistente, ha mutado genéticamente, mediante el gen *mecA*, que impide a la penicilinas semi sintéticas (Oxacilina y Meticilina) bloquear la enzima transpeptidasa que sintetiza la pared celular, esto impide tratamiento con penicilinas semi sintéticas y cefalosporinas (Echeverria & Iglesias, 2003). Considerando la acción nociva del geraniol sobre la membrana citoplasmática de *S. aureus* que mediante la sinergia de los mecanismos de acción de los compuestos de estos aceites esenciales potencializan la actividad antimicrobiana (Jareerat Aiemsaard, Aromdee, Taweechaisupapong, & Khunkitti, 2011) es interesante evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Lippia citriodora* (Lam.), *Thymus vulgaris* (L), *Lippia alba* (MILL) y una mezcla de aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Thymus vulgaris* (75/50 v/v), frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* Oxacilina-resistente (n=15) de mastitis bovina.

### **8.1 Aceites esenciales frente a *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistente**

La mastitis bovina es uno de los principales problemas económicos en la industria de leche, especialmente relacionada con microorganismos patógenos, siendo el *Staphylococcus spp.*, uno de los principales involucrados (Diaz, y otros, 2010). El uso profiláctico de antibióticos en la prevención de la mastitis bovina y los malos manejos han generado resistencias en los microorganismos como el caso de *Staphylococcus aureus* frente a la Oxacilina, lo que dificulta el control y manejo de esta enfermedad (Erskine, Cullor, Schaellibaum, Yancey, & Zecconi, 2004). La Organización Mundial de

la Salud, ha catalogado la resistencia a los antibióticos como un problema sanitario de alto impacto para la salud y el desarrollo. En este sentido, se requiere explorar de nuevas alternativas terapéuticas entre ellas el uso de productos a base de plantas naturales.

Específicamente, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* y el timol, su principal compuesto, ha mostrado ser de interés en el tratamiento de la mastitis bovina (Pozzo, Santurio, Rossatto, Vargas, & Alves, 2011), puede reducir la internalización del *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas e inhibir la producción de óxido nítrico (Zhengkai, y otros, 2014). Algunos estudios han evaluado los cambios morfológicos en *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente en presencia del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) que tiene compuesto predominantes como citral (74%) y la mezcla geranial (40.56%) y neral (33.71%), geraniol (4.64%), encontrando daños en la membrana citoplasmática que pueden ser ocasionados por la sinergia de los mecanismos de acción de los compuestos que potencializan la actividad antimicrobiana (Jareerat Aiemsaard, Aromdee, Taweechaisupapong, & Khunkitti, 2011).

## 8.2 *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistente

Fueron estudiados 15 aislados de *Staphylococcus aureus*, de casos mastitis subclínica y clínica en bovinos de la sabana de Bogotá – Colombia, previamente caracterizados en el Laboratorio de Microbiología, Facultad de Veterinaria. A través del método *Kirby-Bauer* se evaluó la resistencia a la Oxacilina (NCCLS, 2000) Almacenados en condiciones de congelación. Descongelados y cultivados en agar sangre incubados a 37 °C 24 horas para la ejecución de las pruebas.

Se empleó la técnica de *Kirby-Bauer* anteriormente descrita e igualmente se prepararon los discos con los aceites esenciales y la mezcla a evaluar impregnando discos de 7 mm de papel filtro estéril (Iturriaga, Olabarrieta, & Marañón, 2012) (densidad 140g/cm<sup>2</sup>), con 20 µL de aceite (Fratini, y otros, 2014).



### 8.2.1.1 Análisis Estadístico

Se usó el paquete estadístico IBM SPSS (versión 22.0), se utilizó la prueba Kruskal Wallis para evaluar diferencias significativas entre las medianas de los halos de inhibición de los aceites esenciales.

La actividad antimicrobiana se evaluó a partir de los diámetros de inhibición de crecimiento de los aislados de *Staphylococcus aureus*-Oxacilina resistente (n=15), generados por los discos impregnados de aceites esenciales ver Tabla 13:

**TABLA 13 HALOS DE INHIBICIÓN DE *Staphylococcus aureus*-OXACILINA RESISTENTE PARA LOS ACEITES ESENCIALES Y LA MEZCLA (N=15)**

Aceite esencial Parámetro (mm)	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lippia citriodora</i>	<i>Lippia alba</i>	Mezcla (LC/TV)
Media	23.93 +/- 1.55	24.40 +/- 1.66	21.00 +/- 3.41	32.07 +/-2.31
Mediana	24.00	24.00	14.00	40.00
Mínimo	12	18	6	19
Máximo	36	45	45	40

Se calculó el porcentaje de aislamientos con un diámetro de inhibición superior a 21 mm, encontrando que solo el 33.33% de aislamientos superaban este valor para el AE. *Lippia alba*, el 73.33% para el caso del AE. *Thymus vulgaris*, un 80.00% para la el AE. de *Lippia citriodora*, y un 86.67% la mezcla de aceites esenciales (AEC/AET 75/50).

Para determinar diferencias significativas entre los aceites y la mezcla, se aplicó prueba estadística de *Kruskal Wallis* a fin de comparar las medianas para pruebas no paramétricas. Encontrando diferencias significativas para la mezcla de aceites esenciales (AEC/AET 75/50) frente a los aceites esenciales puros con un  $p=0.019$ . Esto evidencia que la mezcla de aceites esenciales (AEC/AET 75/50) potencia la actividad antimicrobiana de los aceites puros igualmente para las *S. aureus* Oxacilina resistente.

Siendo una posible alternativa frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a la Oxacilina aisladas de casos positivos de mastitis bovina.

## 9 FASE *IN VITRO*. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA

La concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) fue determinada con base en el documento M26 (CLSI, 1999), el método describe que se hace en la primera columna una distribución de 200  $\mu\text{L}$  de solución con una concentración de 20:200 de mezcla de aceites esenciales (AEC/AET 75/50) y una distribución de 100  $\mu\text{L}$  de caldo Muller Hinton en el resto de los pozos. De la primera columna se toman 100  $\mu\text{L}$  y se depositan en la segunda y así sucesivamente, desechando la última columna para obtener concentraciones de 20:200, 10:200, 5:200, 2.5:200 y 1.25:200 y un último pozo de 200  $\mu\text{L}$  de caldo inoculado por *Staphylococcus spp* sin mezcla para control. Posteriormente se inocula con 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de turbidez a escala 0.5 Mc Farland de *Staphylococcus spp* (n=80) preparado en caldo Muller-Hinton. Se incubó durante 24 horas a 37°C y posteriormente, se registra la concentración que no muestra turbidez. Finalmente, para determinar la CMB, se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de los pozos y se siembran en agar Mueller-Hinton evaluando el crecimiento bacteriano después de 24 horas de incubación a 37°C. Se registró la concentración más baja de la mezcla que no mostró crecimiento Figura 15.

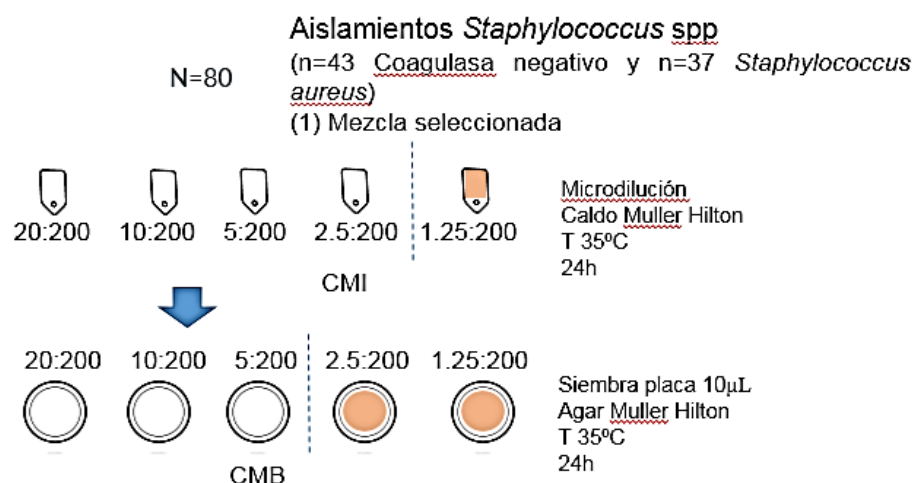


FIGURA 15 CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

## 9.1 Análisis Estadístico

La concentración mínima bactericida para la mezcla se identificó a partir de la concentración capaz de destruir la muestra inoculada en condiciones estándar lo que se verificó a través del no crecimiento de la alícuota sembrada contrario a lo que se presenta en la figura 16.



**FIGURA 16 EVIDENCIA DE CRECIMIENTO**

De las 80 aislamientos el 92.5 % mostró una concentración mínima bactericida de 5:200 es decir del 2.5%. (25  $\mu$ L/mL), como se observa en la Tabla 14.

**TABLA 14 CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA**

		<b>CMB</b>			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0	1	1,3	1,3	1,3
	10:200	7	8,8	8,8	10,0
	5:200	66	82,5	82,5	92,5
	2.5:20	5	6,3	6,3	98,8
	0				
	1.25:2	1	1,3	1,3	100,0
	00				
	Total	80	100,0	100,0	

Igualmente se evidenció que existe correlación entre la CMB y los halos de inhibición evaluados ( $p < 0.05$ ).

Igualmente se encontró correlación de los halos de inhibición y la concentración mínima bactericida para los aislados n=80 para la mezcla evaluada  $p < 0.05$ , empleando la prueba de Rho Spearman como se observa en la Tabla 15. Esto quiere decir, que a medida que aumenta la concentración de la mezcla de aceite es mayor el halo de inhibición en la siembra.

**TABLA 15 PRUEBA DE RHO SPEARMAN**

<b>Correlaciones</b>				VAR0000 4	VAR0000 5
Rho Spearman	de CMB	Coeficiente	de	1,000	,353**
		correlación		.	,001
		Sig. (bilateral)		80	80
	Halo mm	Coeficiente	de	,353**	1,000
		correlación		,001	.
		Sig. (bilateral)		80	80
		N		80	80

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

## **10 FASE IN VIVO. EVALUACIÓN DE UN SELLADOR DE BARRERA A BASE DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE MASTITIS BOVINA**

Con el propósito de prevenir la mastitis en los hatos, se emplean selladores antimicrobianos de barrera que crean una película en el canal del pezón, el agente antimicrobiano impide el ingreso de microorganismos patógenos. Regularmente este tipo de productos son a base soluciones yodóforas, con efectos corrosivos, generando efectos secundarios sobre el bienestar de la ubre especialmente en las condiciones climáticas de la sabana de Bogotá, y no siendo del todo efectivos sobre los microorganismos causantes de la mastitis en esta región. Por lo anterior, se evaluó la eficacia de un sellador de barrera a base de una mezcla de aceites esenciales de tomillo y cedrón, usando como control un sellador de barrera de base yodóforas; sobre la incidencia de mastitis bovina haciendo seguimiento al recuento de células somáticas por microscopia directa, el Test de California; así como muestreo microbiológico para identificar la presencia de bacterias patógenas. El estudio se realizó en municipio de Chocontá a 2650 msnm (Cundinamarca-Colombia), y contempló las siguientes etapas, figura17:

1. Etapa diagnóstica: Evaluar la prevalencia de mastitis en los hatos de estudio.
2. Etapa de formulación: Realizar la formulación del sellador a base de aceites esenciales para proteger la punta del canal del pezón bovino contra microorganismos causantes de mastitis.
3. Etapa de evaluación: Implementar un modelo *in vivo* para evaluar el efecto en la incidencia de mastitis bovina. El periodo de evaluación fue desde el 16 de abril al 16 de mayo de 2019 (30 días), que coincide con la época de lluvias y los mayores casos de incidencia de mastitis en la región.

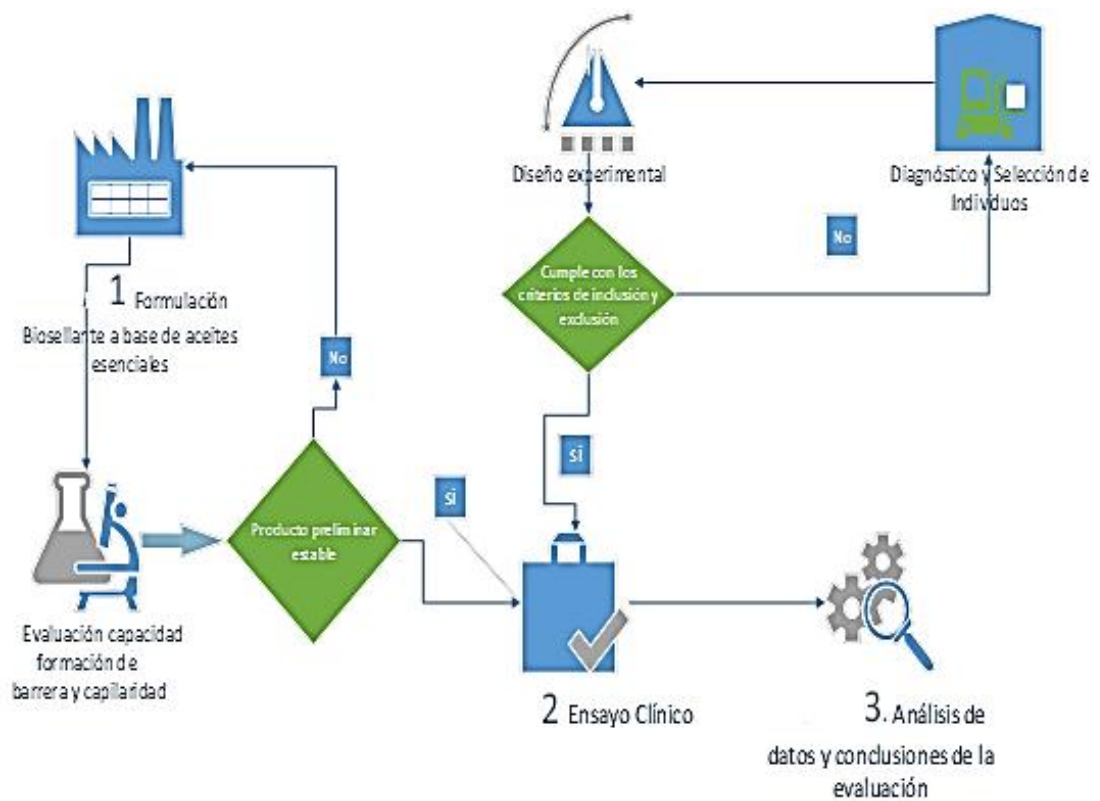


FIGURA 17 ETAPAS EVALUACIÓN DEL SELLADOR A BASE DE ACEITES ESENCIALES

## 10.1 ETAPA DIAGNÓSTICA

### 10.1.1 Localización y periodo de estudio

El estudio se localiza en el municipio de Chocontá – Cundinamarca (Colombia), a 2650 msnm. Con temperatura promedio de 12.1 °C, mínimas de 9.6 °C y máximas de 14.6°C; y precipitaciones de 883 mm. Los meses de mayor precipitación son abril, mayo y

octubre y el periodo más seco se presenta en el mes de enero<sup>6</sup>. Por lo anterior, el periodo de estudio se realizó en la época de mayor precipitación entre el 16 de abril y el 17 de mayo de 2019.

#### 10.1.2 Hato lechero

Las pruebas se realizaron en dos hatos lecheros ubicados en la misma vereda del municipio de Chocontá, sin diferencias significativas en su proceso productivo: ordeño manual (dos veces en el día), alimentación con pastoreo rotacional de *Pennisetum clandestinum*, suplementado con concentrado compuesto por cereales, melaza, y complementos nutricionales (vitaminas y minerales). Las razas Holstein (7) y Jersey (5) fueron incluidas en el estudio, con un total de N=12 animales.

#### 10.1.3 Estado de animales y pezones

De acuerdo con la información suministrada por los hatos, 5 animales no habían presentado casos de mastitis anteriores al tiempo de estudio, 4 animales si presentaron casos de mastitis previos al estudio, y 3 animales no tenían historial alguno. Igualmente, se diagnosticó el estado actual de los animales por pezón usando las siguientes técnicas:

##### 10.1.3.1 Prueba de California para Mastitis (CMT)

Esta prueba permite obtener una apreciación del recuento de células somáticas presente en la leche, es una prueba subjetiva que da una valoración de bajo o alto. Empleando una paleta con 4 placas, se depositan uno o dos chorros de leche posterior al despunte y limpieza previa del pezón, la paleta se inclina para que el volumen de las placas sea aproximadamente homogéneo. Posteriormente, en cada placa se deposita

---

<sup>6</sup> Registro estación meteorológica Sisga - Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales 2019

un volumen equivalente del reactivo del test de California, se agita y se procede a evaluar la reacción, entre más células somáticas estén presentes en la muestra de leche, más viscosa y espesa será la mezcla según los criterios de la Tabla 16 (Mellenberger, 2019):

**TABLA 16 REACCIONES TEST DE CALIFORNIA.**

Fuente: Elaborado a partir de (Mellenberger, 2019)

REACCIÓN	DESCRIPCIÓN	RANGO CÉLULAS/ML	DE INTERPRETACIÓN
<b>NEGATIVA</b>	No hay espesamiento de la mezcla ni cambio de color.	0-200.000	Pezón sano
<b>TRAZAS</b>	Ligero espesamiento de la mezcla que desaparece al agitarse.	200.000-400.000	Posible infección / Mastitis subclínica
<b>1</b>	Positivo débil, espesamiento de la mezcla sin formación de gel.	400.000-1.200.000	- Mastitis subclínica
<b>2</b>	Positivo evidente, ligera formación de gel.	1.200.000-5.000.000	– Infección seria
<b>3</b>	Positivo fuerte, hay formación de gel con elevación central.	Mayor a 5.000.000	Infección seria

#### 10.1.3.2 Recuento de células somáticas por microscopia directa

Este método es considerado el más preciso para el recuento, y es empleado para calibrar equipos y otras técnicas. A partir de la muestra recolectada (posterior a la limpieza y despunte), debidamente homogenizada y atemperada a 24°C, se recolecta con una pipeta 0.01 ml y se distribuye en un área aforada de 1 cm<sup>3</sup> en un portaobjetos. La muestra en el portaobjetos se seca en una estufa a 40°C durante 15 min y se realiza la tinción Diff –quik™ siguiendo el procedimiento para hematología (Anexo uno). Se hace el recuento de células somáticas directamente en el microscopio tomando 30 a 40 campos. El promedio de células es multiplicado por el factor del microscopio (dependerá del modelo y marca) para dar el valor total de células somáticas por ml (Lagos, 1998).



### 10.1.3.3 Evaluación microbiológica por cultivo

La muestra es recolectada posterior a la limpieza, desinfección con alcohol a 70° y despunte, para evitar contaminación, almacenada conservando la cadena de frío a 4°C. Para realizar el cultivo es retirada del refrigerador y atemperada a temperatura ambiente. A partir de una alícuota de 10µl empleando un asa aforada, se realiza la siembra por agotamiento de muestra, en agar sangre de cordero y se incuba durante 24 – 48 horas a 37°C. Las placas se examinan a 24 h y a 48 h para evidenciar el crecimiento de microorganismos patógenos (Calvinho, 2010).

Los resultados de la evaluación de las técnicas empleadas se presentan en la Tabla 17. La prueba de california da un valor aproximado de las células somáticas presentes en cada pezón, sin embargo, es un resultado subjetivo que depende de la estimación del evaluador, el resultado de este test concluye 20 pezones con células somáticas en rangos normales y 28 pezones en rangos anormales.

**TABLA 17 RESULTADOS DIAGNÓSTICO DE MASTITIS POR PEZÓN**

Animal	Test California			Células somáticas CSS/ml		
	0 Pezones normales	TZ Pezones anormales	1 2	>200.000 Pezones sano	200.000-500.000 Pezones anormales	500.000-800.000
1	3	1		3	1	
2		3	1		3	1
3	2	1	1	3	1	
4	3	1		3		1
5	4			1	3	
6	1	2	1	3	1	
7	3	1		2	2	
8		2	2	2	1	1
9			3 1	1	2	1
10		2	2	1	3	
11		1	3		3	1
12	4			4		
	20		28	23		25

Animal	Presencia patógenos - Cultivo microbiológico	
	Positivo	Negativo
1	2	2
2	2	2
3	1	3
4	2	2
5	2	2
6	3	1
7	2	2
8	0	4
9	1	3
10	0	4
11	0	4
12	0	4
	15	33

La microscopia directa, determina más exactamente el recuento de células somáticas, en este caso los pezones sanos fueron 23 y los pezones anormales 25. Las células somáticas elevadas indican una respuesta inmunitaria de la glándula mamaria, aunque en la mayoría de casos infecciosos existe un incremento de células somáticas, no siempre un elevado recuento de células somáticas responden a casos infecciosos, también pueden ser generados por alguna lesión física en la glándula. Una proporción elevada de neutrófilos, son consecuencia de una respuesta inmunológica por infección generada por agentes patógenos.

Finalmente, la identificación de patógenos presentes en la leche, determina la infección intramamaria, según el análisis microbiológico tan solo 15 pezones de los 48 pezones incluidos, no presentaban infección. La prevalencia de mastitis en los hatos de estudio puede ser resultado de las malas prácticas de manejo e higiene, factores climáticos que contribuyen a la proliferación de microorganismos patógenos y mal manejo de infecciones anteriores al estudio. A pesar de lo anterior, los pezones no presentaban

ninguna irritación, grieta o daño visible en el momento de la prueba, lo que corresponde posiblemente a casos de mastitis subclínica.

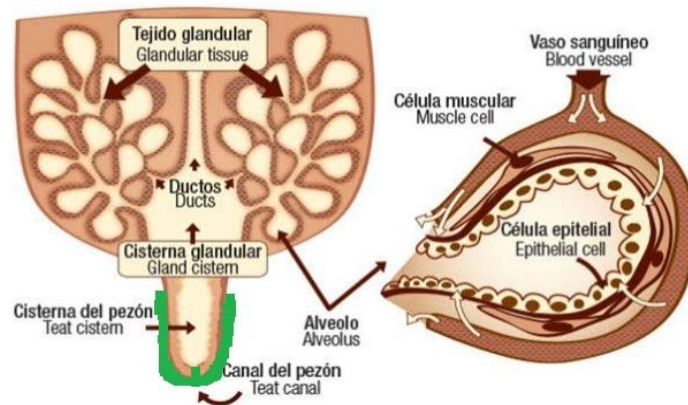
## 10.2 ETAPA FORMULACIÓN

Para la formulación del sellador se emplearon aceites esenciales como ingrediente activo de las plantas: *Thymus vulgaris* (L) y *Lippia citriodora* (H.B.K.) previamente obtenidos y caracterizados por cromatografía de gases masas, en una concentración de 0.6-2.5% (según la caracterización obtenida) en mezcla potenciando su efecto de acuerdo con los experimentos anteriores. La citotoxicidad de los aceites esenciales, fue comparada previamente con otros agentes antimicrobianos así como sus dosis, para garantizar la inocuidad del sellador.

Para la formación de película se empleó un gel polisacárido, factor determinante en el proceso de sellado del canal del pezón, en este caso metil etil celulosa en una concentración inferior al 1%. Adicionalmente se empleó el glicerol como plastificante y suavizador, empleado en la industria cosmética en lociones con una concentración cercana al 30-50%, entre otros excipientes entre ellos agua, colorantes empleados en la industria de alimentos para evidenciar visualmente la impregnación en el pezón garantizar su correcta aplicación.

Esta formulación preliminar tomó como referencia el producto comercial y productos similares en el mercado. Actualmente, para mitigar los efectos corrosivos del yodo se emplean glicerol para humectar y proteger la ubre. Otros productos, emplean parafinas y ceras como base, pero para garantizar la humectación y efectos suavizadores se empleó en la formulación el glicerol.

Dado que el sellador debe formar una película y una capilaridad en el canal del pezón para garantizar una barrera protectora que impida la migración de microorganismos patógenos además de su efecto bactericida, se realizó prueba de capilaridad y viscosidad comparando con el producto comercial a base de yodo. El propósito es garantizar un taponamiento en el canal del pezón (figura 18) (Echeverría, 2017):



**FIGURA 18 CAPILARIDAD EN EL CANAL DEL PEZÓN**

Fuente: Modificado de Echeverría, 2017

Considerando que el sellador debe formar una película y una capilaridad en el canal del pezón para garantizar una barrera protectora que impida la migración de microorganismos patógenos además de su efecto bactericida, se realizó prueba de capilaridad y viscosidad comparando con el producto comercial a base de yodo. El propósito es garantizar un taponamiento en el canal del pezón (figura 18) (Echeverría, 2017):

Dentro de estas pruebas se garantizó el tiempo de descenso en un capilar de 3 mm de una cantidad de 200  $\mu$ l, una longitud mínima de 4 cm, fuese igual que el producto comercial. Así como un mínimo goteo al impregnar la ubre, figura 19.



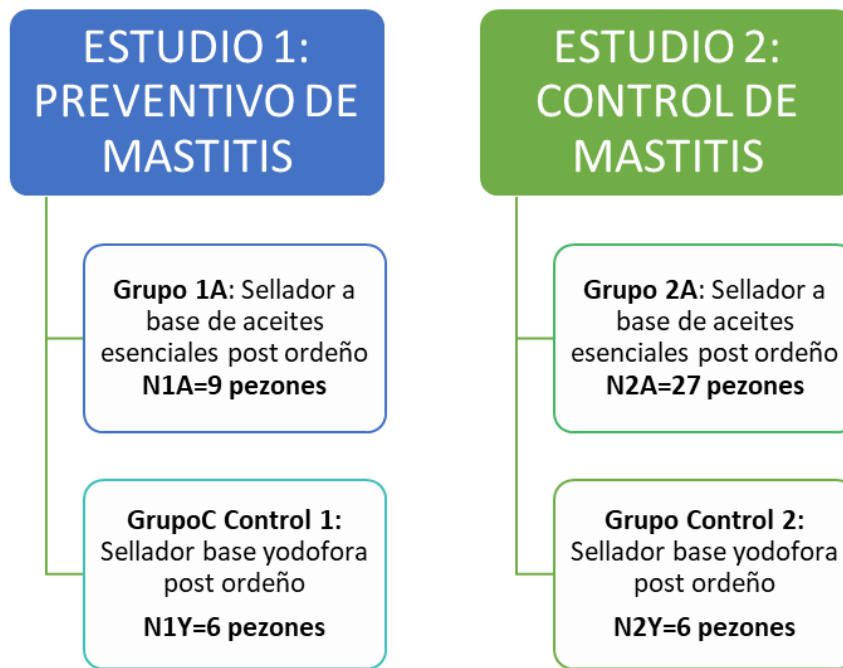
**FIGURA 19 SELLADOR A BASE DE ACEITES ESENCIALES**

Otro de los factores adicionales es que no se disolviera inmediatamente al contacto con el agua, es decir que la gota de sellador permaneciera en el tiempo dentro de un recipiente con agua, a pesar de ser de fácil retiro y limpieza.

## 10.3 ETAPA DE EVALUACIÓN

### 10.3.1 Diseño experimental

Inicialmente se planteaba un estudio preventivo del sellador a base de aceites esenciales, siendo uno de los criterios de selección el empleo de animales sin prevalencia de mastitis, y células somáticas inferior a 200.000 CCS/ml. Sin embargo, dado el diagnóstico obtenido, y el número elevado de pezones con cultivo positivo de microorganismos patógenos, aunque sin síntomas clínicos, se replanteó la evaluación en dos estudios. Un primer estudio preventivo de mastitis (N =15 pezones) y un segundo estudio de control de mastitis (N= 33 Pezones). El diseño dependió de la prevalencia de mastitis en los animales figura 20, en el cual propone 3 animales que usen el sellador yodóforo (12 pezones) y 9 animales que empleen sellador a base de aceites (36 pezones). El procedimiento experimental fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.



Variables:

- ✓ Test california
- ✓ Conteo Células somáticas microscopia directa
- ✓ Cultivo microbiológico

**FIGURA 20 DISEÑO EXPERIMENTAL**

### 10.3.2 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión dependieron del objetivo de cada estudio, según la Tabla 18, en general: animales con buen peso corporal, hembras de la zona geográfica de estudio, de 2-6 años, en periodo de lactancia, y total de pezones funcionales. Como criterio de exclusión en cualquier momento de los estudios, se tomó que el animal presentara síntomas clínicos, irritación, dolor o secreción. En dicho caso, el pezón se eliminaba del estudio y sería tratado con antibióticos convencionales según indicaciones del veterinario a cargo.

**TABLA 18 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>	
<b>Especie</b>	<i>Bovinos</i>
<b>Raza/estirpe</b>	Se trabajará con razas bovinas de los hatos seleccionados en el estudio incluyendo: <i>Holstein</i> y <i>Jersey</i> y cruces de estas razas de acuerdo a la caracterización que se haga in situ.
<b>Sexo</b>	Hembras
<b>Edad</b>	Por identificar de acuerdo a los hatos seleccionados para el estudio en un rango 2-6 años
<b>Tamaño corporal</b>	Por identificar de acuerdo a los hatos seleccionados para el estudio Se seleccionará animales de tamaño óptimo y saludable
<b>Peso</b>	Por identificar de acuerdo a los hatos seleccionados para el estudio: En rangos saludables
<b>Procedencia</b>	Hatos seleccionados para el estudio- Municipio de Chocontá – Cundinamarca. Altura sobre nivel del mar 2.650-2.900 msnm
<b>Otras</b>	Dado que se evaluará el uso preventivo como criterio de selección serán animales sanos. Sin problemas visuales en la ubre. En periodo de lactancia, con pezones funcionales Sin tratamiento de antibiótico o antiinflamatorio

El procedimiento a seguir es el siguiente: Aplicación tópica de biosellante a base de aceites esenciales /sellante comercial a base de yodo. El protocolo para la aplicación del biosellante fue idéntico al protocolo comercial del sellador de yodo (Anexo dos). Con un grado de invasividad mínimo.

### 10.3.3 Variables y periodicidad

Siguiendo los procedimientos incluidos en la etapa de diagnóstico se evaluaron las siguientes variables:

**TABLA 19 VARIABLES A EVALUAR**

<b>Prueba de california para mastitis</b>	Inicio – 15 días de evaluación- Final
<b>Recuento células somáticas microscopia directa</b>	Inicio – 15 días de evaluación- Final
<b>Cultivo microbiológico de muestra</b>	Inicio-Final

### 10.3.4 Estudio 1. Preventivo de mastitis

De acuerdo con la estadística descriptiva, las características de los individuos de los grupos son homogéneos al inicio del estudio, con media y desviación similar. Un pezón fue descartado del grupo sellador a base de aceites esenciales a los 2 días de iniciar el estudio, considerando el número elevado de células somáticas al inicio del estudio y presentar daños visibles en el pezón, siguiendo el protocolo establecido, se descartó y fue tratado por el veterinario a cargo con tratamiento intramamario no sistemático y no se afectaron el resto de los cuartos del animal. En este sentido, el grupo estudio se redujo a N=8 pezones y el grupo control de base yodófora continuó con N=6 pezones.

El seguimiento y análisis se realizó en un periodo de 30 días, analizando las tres variables: en la prueba de california se puede observar de forma general en la figura 21, que el sellador a base de aceites esenciales mantuvo a trazas y cero el recuento de células somáticas; con algunas variaciones a los 15 días en algunos de los casos, pero al comparar con los resultados del recuento por microscopia directa no hubo correlación, lo anterior evidencia que esta prueba es subjetiva y depende de la observación del evaluador de la mezcla.

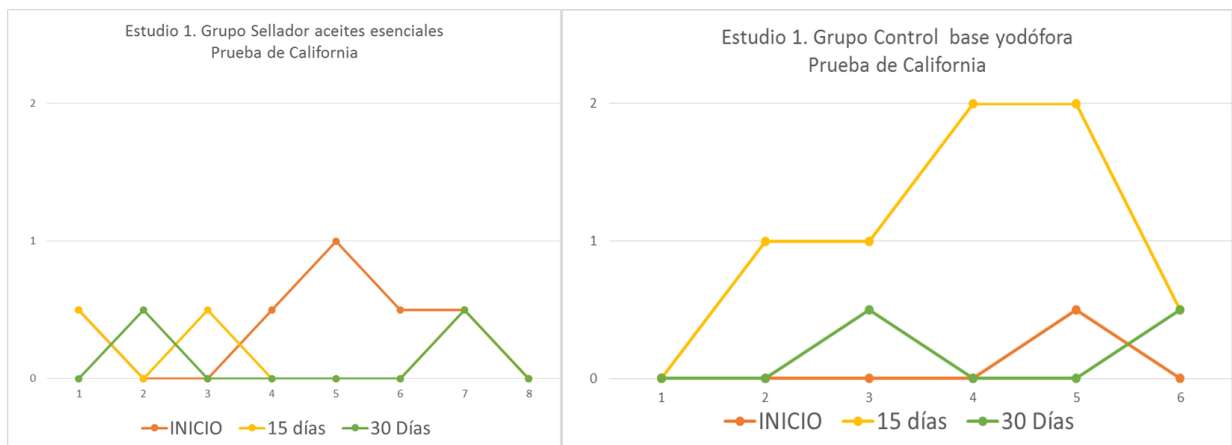
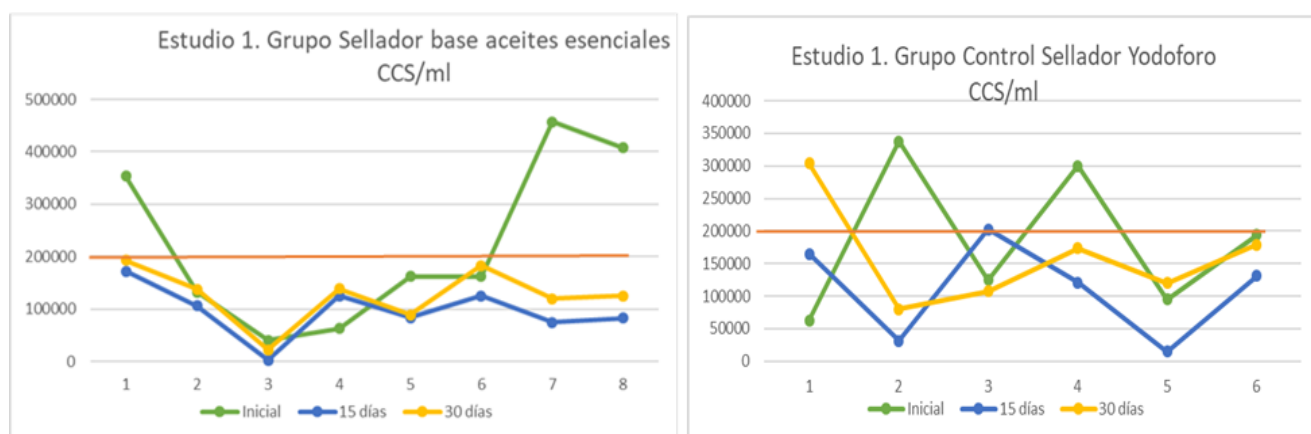


FIGURA 21 ESTUDIO 1. PRUEBA DE CALIFORNIA



Sin embargo, al finalizar el periodo de evaluación la Prueba de test de California permite observar en la mayoría de casos que ambos grupos se encuentran en rangos normales.

El recuento de células somáticas por microscopia directa (figura 22), indica que al inicio de la evaluación, 3 de los 8 casos del grupo sellador a base de aceites esenciales estaban por encima de los 200.000 CCS/ml, lo que indica algún tipo de inflamación y dado que el cultivo microbiológico fue negativo para estos casos, no corresponde a una respuesta por infección; puede ser resultado de otro tipo de lesión.

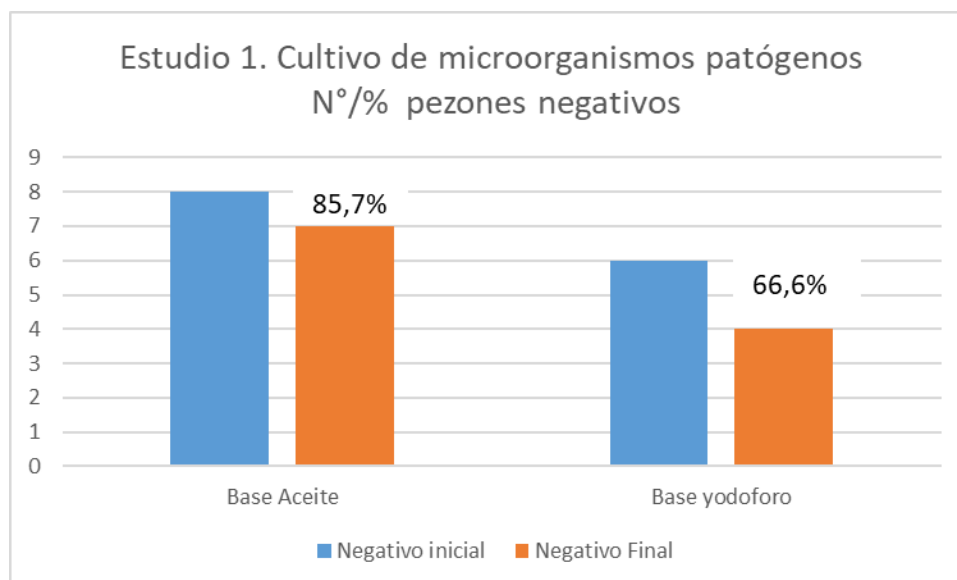


**FIGURA 22 ESTUDIO 1. CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS MICROSCOPIA DIRECTA**

A pesar de eso, se puede observar que pasado 15 días los valores retornan al rango normal que puede deberse a un posible efecto antiinflamatorio de la mezcla glicerol+aceite esencial o una respuesta restauradora natural del animal, que se podría explorar en un siguiente estudio. Igualmente, se presenta en 2 de los 6 casos tratados con el sellador yodóforo que también tiene dentro de su composición agentes hidratantes como el glicerol. Sin embargo, en uno de los casos del grupo control, se puede evidenciar, que las células somáticas van en aumento tras los días de aplicación, lo que muestra un efecto contrario a la prevención deseada en el producto.

Finalmente, la evaluación a través del cultivo microbiológico para detectar microorganismos patógenos en la leche, muestra la efectividad del producto en el periodo de estudio, según la figura 23, se puede observar que 2/6 casos tuvieron

presencia de patógenos al terminar el estudio, es decir tan solo un 66,6% de los pezones el producto con base yodófora actuó preventivamente, esto concuerda con lo reportado en otros estudios (RODRÍGUEZ, 2016).



**FIGURA 23 ESTUDIO 1. CULTIVO MICROBIOLÓGICO MUESTRA EN LECHE**

Para el grupo sellador a base de aceites esenciales el producto mantuvo su efecto preventivo en 7 de los 8 casos, es decir en un 85,7%. A pesar de la diferencia en los porcentajes de efectividad debido al tamaño de la muestra, no se puede concluir diferencia significativa entre los dos grupos.

El análisis estadístico Tabla 20 nos determina que la variable recuento de célula somática al finalizar el periodo tiene una distribución normal:

**TABLA 20 PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA UNA MUESTRA**

		CCS final
N		14
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	140803,57
	Desv. Desviación	65709,16
	Absoluto	,155

Máximas diferencias extremas	Positivo	,155
	Negativo	-,106
Estadístico de prueba		,155
Sig. asintótica(bilateral)		,200 <sup>c,d</sup>

- La distribución de prueba es normal.
- Se calcula a partir de datos.
- Corrección de significación de Lilliefors.
- Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

A partir de esto, se realiza la prueba de T, Tabla 21, para evaluar si existen diferencias significativas en el recuento de células somáticas finales entre el sellador a base de aceites esenciales y el sellador a base de solución yodófora para la prevención de la mastitis bovina.

**TABLA 21 PRUEBA T EVALUAR DIFERENCIAS ENTRE LOS DOS TRATAMIENTOS -ENSAYO 1**

	trata	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
CCS/final del estudio	Sellador Yodóforo	6	160625,00	79948,22	32638,73
	Sellador base aceites esenciales	8	125937,50	53513,80	18919,99

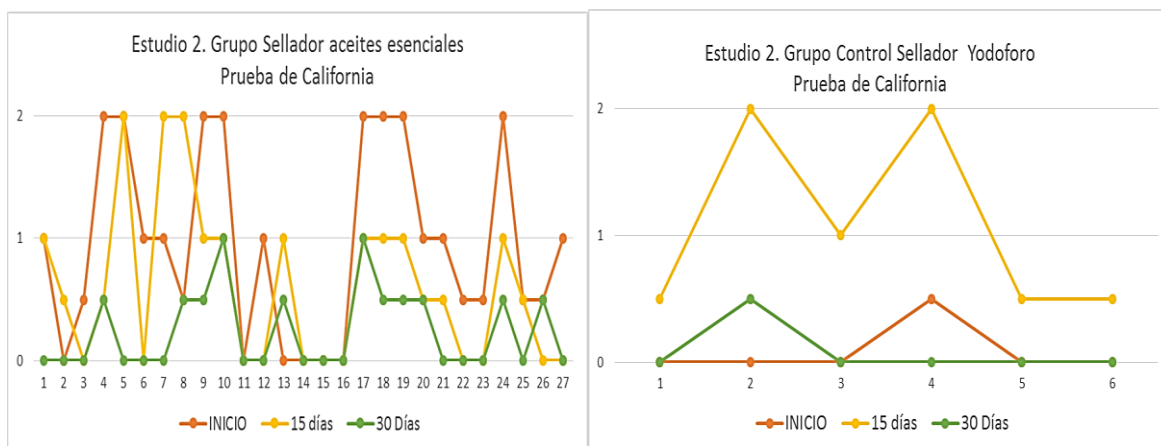
		Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	
CCS/final del estudio	Se asumen varianzas iguales	,891	,364	,976	12	,348
	No se asumen varianzas iguales		,919	8,259		,384

El p valor es mayor a 0.05, esto quiere decir que no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos a partir de los datos obtenidos con una confianza del 95%.

### 10.3.5 Estudio 2. Control de mastitis

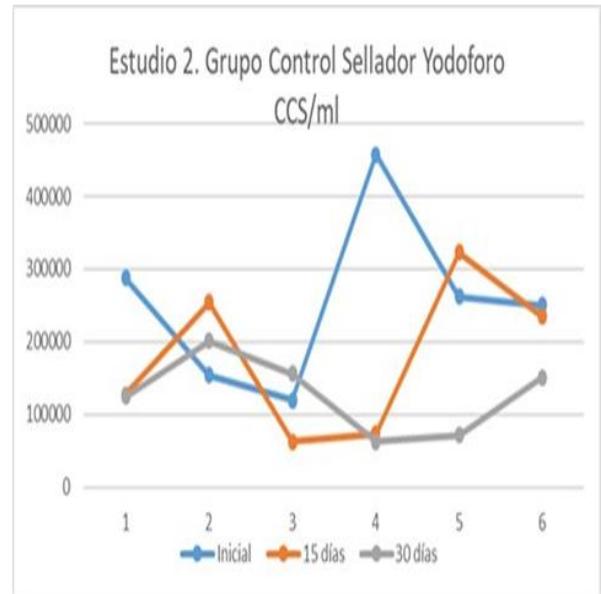
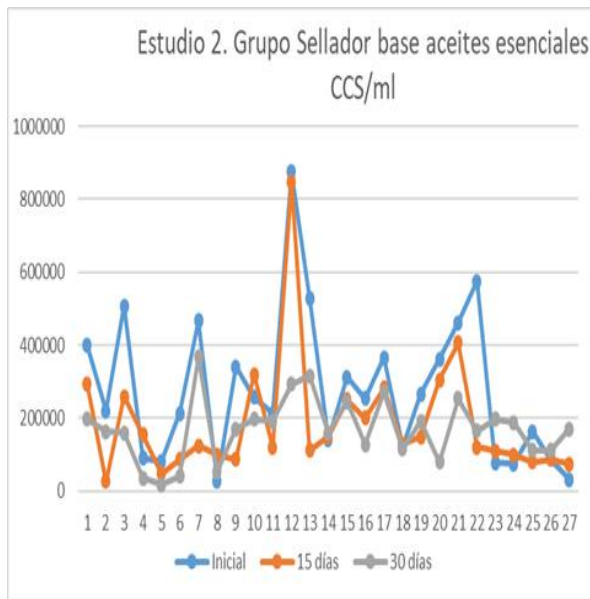
El estudio incluyó en total 33 pezones con cultivo positivo de microorganismos patógenos: N 27 en el grupo sellador a base de aceites esenciales y N 6 pezones en el grupo control con sellador base yodófora. Durante el periodo de estudio no se evidenciaron daños visibles en la ubre, muestra de dolor, grietas o cualquier daño que pusiera en riesgo el animal. Se puede observar en la prueba de California (figura 24),

que en el grupo estudio y grupo control la estimación de células somáticas disminuyen al finalizar el periodo de evaluación. Igual que el estudio anterior, en el grupo control se observa un incremento no esperado a los 15 días, que se atribuye a la subjetividad del test, dado que esta situación no se observa en el recuento de células somáticas por microscopia directa (figura 25).



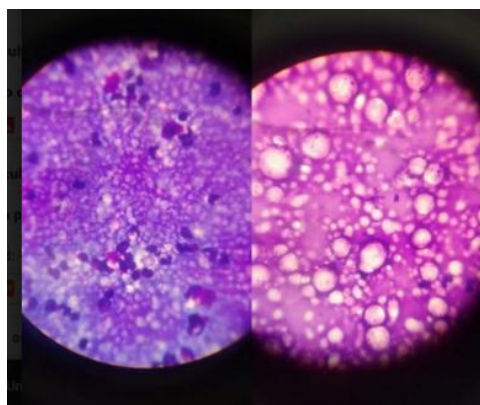
**FIGURA 24 ESTUDIO 2. PRUEBA DE CALIFORNIA**

De otra parte, en el conteo de células somáticas por microscopia directa (figura 25), se puede observar en el grupo sellador a base de aceites esenciales, que el recuento de células somáticas disminuye en todos los casos de forma paulatina, esto no se observa en todos los casos en el grupo control a base de solución yodófora, dado que en 2 de los 6 casos las células somáticas tendieron a subir, lo que no se espera en este tipo de productos veterinarios. Lo anterior puede ser consecuencia de la acción corrosiva del yodo, que puede causar inflamación a pesar de su acción antimicrobiana, efecto que no se evidencia en la mezcla glicerol-aceite esencial. Así mismo, se puede observar un descenso significativo de células somáticas por mL en el pezón 12, nuevamente se observa la capacidad antiinflamatoria de la mezcla glicerol – aceites esenciales, figura 26.



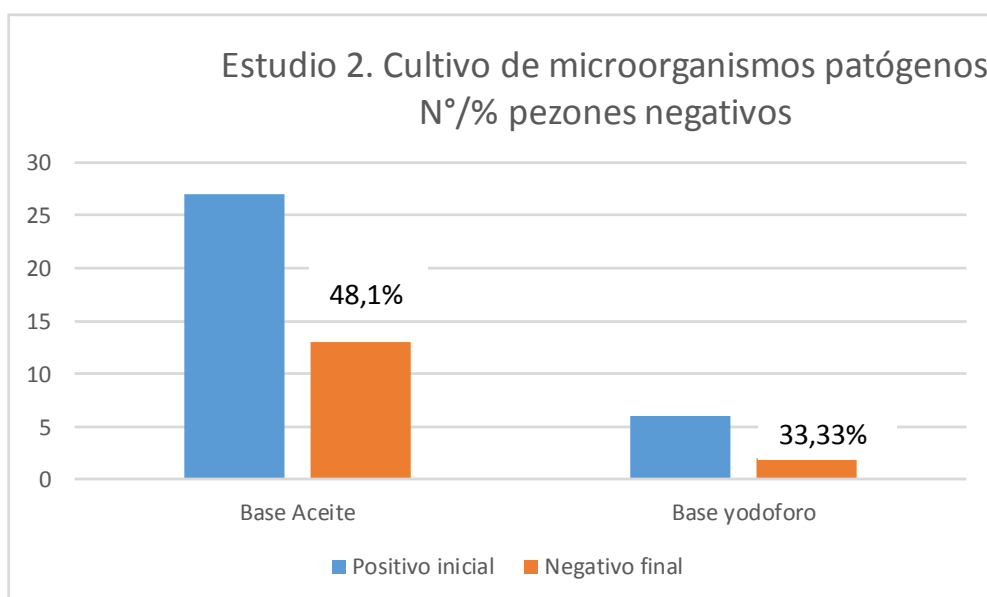
**FIGURA 25 ESTUDIO 2. CÉLULAS SOMÁTICAS MICROSCOPIA DIRECTA**

Capacidad que se reporta en estos aceites esenciales puros por sus flavoides y taninos (Lira, 2016), y su capacidad antioxidante, como la reportada en un estudio realizado con el suplemento PLX®, capsulas de extracto estandarizado de cedrón (*Lippia citriodora*), en el cual evaluaban los niveles de daño oxidativo ocasionado por el ejercicio físico intenso con el suplemento y un grupo control, concluyendo que el PLX® disminuye los niveles de daño oxidativo y tiene capacidad antiinflamatoria (Carrera-Quintanar, Funes, J. Tur, Roche, & Pons, 2010).



**FIGURA 26 DESCENSO CCS PEZÓN N 12**

En cuanto al cultivo microbiológico para identificar la presencia de microorganismos patógenos en la muestra de leche (figura 27), al inicio del estudio, el grupo aceites esenciales N=27 pezones con infección, y el grupo control de base yodófora N =6 pezones con infección. Al finalizar el periodo de estudio los pezones infectados de este estudio disminuyeron en ambos grupos a: grupo base aceites esenciales N =14 y grupo control de base yodófora a N= 4. Esto significa que ambos productos tienen capacidad de controlar la infección, a pesar de no ser una alternativa terapéutica.



**FIGURA 27 ESTUDIO 2. CULTIVO MICROORGANISMOS EN MUESTRA DE LECHE**

El sellador a base de aceites esenciales disminuyó la incidencia de mastitis en un 48,1% y el sellador a base de solución yodófora en un 33,3%, sin diferencias significativas.

Del mismo modo que para el estudio 1, se realiza el análisis estadístico que determina que la variable Recuento de célula somática al finalizar el periodo tiene una distribución normal, Tabla 22.

**TABLA 22PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA UNA MUESTRA- ENSAYO 2**

		CCS final
N		33
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	162534,09

	Desv. Desviación	82292,467
Máximas diferencias extremas	Absoluto	,137
	Positivo	,137
	Negativo	-,082
Estadístico de prueba		,137
Sig. asintótica(bilateral)		,118 <sup>c</sup>

- a. La distribución de prueba es normal.
- b. Se calcula a partir de datos.
- c. Corrección de significación de Lilliefors.

Se realiza la prueba de T para evaluar si existen diferencias significativas en el recuento de células somáticas finales entre el sellador a base de aceites esenciales y el sellador a base de solución yodófora en el control de la mastitis bovina, Tabla 23.

**TABLA 23 PRUEBA T EVALUAR DIFERENCIAS ENTRE LOS DOS TRATAMIENTOS -ENSAYO 2**

<b>Estadísticas de grupo</b>					
	tratamiento	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
CCS/final del estudio	Yodoformo	6	127916,67	53336,59	21774,57
	Aceite esencial	27	170226,85	86311,96	16610,74
				Sig.	Sig. (bilateral)
CCS/final del estudio	Se asumen varianzas iguales	,920	,345		,261
	No se asumen varianzas iguales				,146

El p valor es también mayor a 0.05 esto quiere decir que no existen diferencias significativas entre el tratamiento a base de solución yodófora y base de aceites esenciales con una confianza del 95%.

## 11 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir:

1. La destilación por arrastre de vapor es un método económico y viable para un escalamiento a planta piloto. Se hace preciso evaluar la destilación por fluidos supercríticos que permitiría tener aceites de mejor calidad y mayores rendimientos. Especialmente en el caso del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Lippia origanoides*.
2. No solo el proceso de extracción influye en la calidad del aceite, si no que los metabolitos secundarios de la planta responden a las condiciones climáticas y características del suelo. Aceites esenciales con contenido de timol del 59% varía la CMB de 2.5 a 0.6%.
3. Dado que la citotoxicidad, presenta en un rango de  $CL_{50}$  10-19  $\mu\text{g/ml}$ , comparando con otros agente microbianos como Triclosan e Itriconazol, son poco tóxicos y seguros, pero teniendo en cuenta el bioensayo con *Artemia* al ser menores que 30  $\mu\text{g/ml}$ , tienen una toxicidad elevada, lo que abre un espectro para evaluar la capacidad antioxidante, antitumoral y posible efecto plaguicida.
4. Los principales compuestos de los aceites esenciales evaluados, trabajan en conjunto para optimizar la capacidad antimicrobiana, de acuerdo con la cromatografía de gases-masas son: limoneno, neral y geranial, y el timol, por lo que es de interés evaluar otras plantas aromáticas para incrementar los porcentajes de estos compuestos y mejorar la eficiencia.



5. En la evaluación de la actividad antimicrobiana, se concluye que existen diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas frente a los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Thymus vulgaris* mostrando una actividad antimicrobiana ( $p < 0.05$ ), así como una sensibilidad de estas cepas frente al Cloranfenicol y una resistencia a la Clindamicina ( $p < 0.05$ ). El *Staphylococcus aureus* presenta mayor resistencia frente a los antibióticos convencionales sin embargo mantiene la sensibilidad frente a los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Thymus vulgaris*.
6. Se demuestra un efecto sinérgico de la mezcla de aceites esenciales (75% AEC /25% AET) que potencia su actividad antimicrobiana optimizando su eficiencia terapéutica ( $p < 0.05$ ). La concentración mínima bactericida (CBM) de la mezcla (75% AEC /25% AET) fue determinada en 2.5% efectiva para el 92.5 % de las muestras ( $n=80$ ) Igualmente se concluye que existe correlación entre la CMB y los halos de inhibición evaluados ( $p < 0.05$ ).
7. En el estudio *In vivo* que evaluó la prevención de la mastitis bovina se concluye con un nivel de confianza del 95%, que no existen diferencias significativas entre el grupo sellador a base de aceites esenciales y el sellador a base de la solución yodófora.
8. En el estudio que evaluó el control de la mastitis en los casos positivos, se concluye que no existen diferencias significativas entre el sellador a base de aceites esenciales y el producto comercial (confianza del 95%).

En resumen se concluye, que los aceites esenciales evaluados son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos predominantes de la mastitis en bovinos y son una posible estrategia para su prevención y control; pudiendo ser una estrategia para disminuir el uso profiláctico de antibióticos y contrarrestar a las bacterias resistentes a antibióticos.

## 12 PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

Con los resultados obtenidos en esta tesis, se ha formulado un proyecto que profundizará los estudios *in vivo* y realizará protocolos de evaluación de estabilidad, capacidad microbiológica de acuerdo con la normatividad que le aplica a productos antimicrobianos de uso veterinario (equivalente en España a UNE-EN 1656-2010), que se presentó a la *Segunda Convocatoria de innovación entre universidades y empresas para la promoción y validación de productos derivados del aprovechamiento sostenible de la biodiversidad en el Departamento de Cundinamarca – 2018*, dentro del programa Colombia Bio, que será financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación –COLCIENCIAS- en Colombia.

## 13 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-González-, A. E., & López-Malo. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 35-41.
- Aguilar-González, A. E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/ or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* , 32, 181-185.
- Alba Gonzalez, A., Bonilla Rivera, P., & Arroyo Acevedo, J. (2009). Healing activity of ointment the essential oil of the *Schinus molle* L. “molle” in front to the wounds infected in the cattle and in mice. *Ciencia e Investigación* , 12(1), 29-36.
- Alkan, D., & Yemenicio, A. (2016). Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens. *Food Hydrocolloids*, 55, 1-10.
- Barrera, L., & García, L. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista 34 UDO Agrícola*, 8(1), 33-41.
- Benavides, J. (1989). *Guazuma ulmifolia*. *Encyclopédie Méthodique, Botanique*, 52(3), 246-250.
- Bernal, H. Y., Martínez, H. G., & Sánchez, G. F. (2011). *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia*

- (Primera ed.). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Bernal, M., & Guzman, M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*, 112-121.
- Bernal, R., Gradstein, S., & Celis, M. (2015). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales. Bogota: Universidad Nacional de Colombia, [catalogoplantascolumbia.unal.edu.co](http://catalogoplantascolumbia.unal.edu.co).
- Calvinho, L. (2010). *DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE MASTITIS Y SU IMPORTANCIA EN LOS PROGRAMAS DE CONTROL*. Argentina: INTA .
- Carrera-Quintanar, L., Funes, E. V., J. Tur, V. M., Roche, E., & Pons, A. (2010). Antioxidant effect of lemon verbena extracts in lymphocytes of university students performing aerobic training program. *Scand J Med Sci Sports*, 454-461.
- Celis, C., Escobar, P., Hipólito, J., Stashenko, E., & René, J. (2007). Estudio Comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientia et Technica Año XIII*(33), 103-105.
- Choi, J.-Y., Damte, D., Lee, S.-J., Kim, J.-C., & Park, S.-C. (2012). Antimicrobial Activity of Lemongrass and Oregano essential oil against standard antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* and field isolates from chronic mastitis cow. *International Journal of Phytomedicine*, 4(1), 134-139.
- CLSI. (1999). Methods For Determining Bactericidal Activity Of Antimicrobial Agents. *Clinical Laboratory Standards Institute, M26(A)*, ED 1.
- Conpes. (2010). *Política Nacional Para Mejorar La Competitividad Del Sector Lácteo Colombiano*. Bogotá: Conpes 3675.

- Díaz, M. A., Rossi, C. C., Mendonça, V. R., Silva, D. M., Ribon, A. d., Aguilar, A. P., & Muñoz, G. D. (2010). Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), 724-728.
- Echeverría, J. (3 de Noviembre de 2017). *Mastitis de Verano*. Obtenido de III Jornada Anembe de Vaca: <http://anembeformacion.es/>
- Echeverria, J., & Iglesias, D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered*, 195-203.
- Erskine, R., Cullor, J., Schaellibaum, M., Yancey, B., & Zecconi, A. (2004). BOVINE MASTITIS PATHOGENS AND TRENDS IN RESISTANCE TO ANTIBACTERIAL DRUGS. *NATIONAL MASTITIS COUNCIL. RESEARCH COMMITTEE REPORT*, 400-4013.
- Flores, O. R., Centeno, E. A., & Betanco, R. A. (2005). Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades en los animales domésticos, Reserva Natural El Tisey, Estelí. Estelí: Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco.
- Fratini, F., Casella, S., Leonardi, M., Pisseri, F., Ebani, V. V., Pistelli, L., & Pistelli, L. (2014). Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents gainst some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia* , 96, 1-7.
- Gattuso, M., Cortadi, A., Rodriguez, M., Cargo, J., Retta, D., Bandoni, A., . . . Gattuso, S. (2008). Caracteres florales en la identificación de *Achyrocline satuireioides*, *Achyrocline flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* (Asteraceae-Inuleae). . *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(4), 1-10.

- Geethaa, S., Thavamany, P. J., Chiew, S. P., & Thong, O. M. (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *J Adv Pharm Technol Res*, 179–182.
- GONZÁLEZ, O. (2010). BIOPROSPECCIÓN DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS COMO AGENTES DE BIOCONTROL CONTRA *Vibrio campbellii* M1 Y SU USO EN EL CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei*. En *Tesis Maestría en Ciencias*. Baja California. México.
- Iannacone, J., Alvariño, J., Valle Riestra, V., Ymaña, B., & Argota, G. (2016). Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae) . *Rev. Toxicol*, 33: 31-38.
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., & Marañón, I. M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 58-64.
- Janzen, D. (1982). Natural History of Guacimo Fruits (Sterculiaceae: *Guazuma ulmifolia*) with Respect to Consumption by Large Mammals. *American Journal of Botany*, 68(8), 1240-1250.
- Jareerat Aiemsard, S. A., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S., & Khunkitti, W. (2011). The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Research in Veterinary Science*, 91(3), e31-37.
- Kutscher, C. (1998). Determinación de Células Somáticas en Calostro Post-Parto de vacas. *Tesis . Universidad Austral de Chile*, Facultad de Veterinaria.

- Lacerdaa, E., Bauer, L., J. O., Silva, F., & Carvalho, S. (2014). Effect of the dietary inclusion of dried oregano (*Origanum vulgare L.*) on the characteristics of milk from Holstein x Zebu cows. *Animal Feed Science and Technology*, 192, 101-105.
- Lagos, C. R. (1998). *Determinación de Células Somáticas en Calostro Post-Parto de vacas de lechería mediante dos métodos de recuento*. Chile: UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE.
- Lemus, J. G., & Quiñónez, B. L. (2001). OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris*) CULTIVADO EN GUATEMALA, UTILIZADO EN DIVERSIDAD DE PRODUCTOS FITOFARMACÉUTICOS. Guatemala.
- Lira, P. D. (2016). Caracterización fitoquímica del cedrón (*Aloysia citrodora* Paláu, Verbenáceas) en Argentina para su normalización. *Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica*. Buenos Aires. Argentina: Universidad de Buenos Aires.
- Mansourian, A., Boojarpour, N., Ashnagar, S., Beitollahi, J. M., & Shamshiri, A. (2014). The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; An in vitro study. *Journal de Mycologie Médicale*, 24, e163—e168.
- Mellenberger, R. (12 de 07 de 2019). <https://milkquality.wisc.edu/>. Obtenido de [https://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/212/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-prueba-de-mastitis-california\\_spanish.pdf](https://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/212/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-prueba-de-mastitis-california_spanish.pdf)
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*, 45(5):31-34.

- Minagricultura. (12 de 06 de 2019). *www.minagricultura.gov.co*. Obtenido de <https://sioc.minagricultura.gov.co/SICLA/Documentos/002%20Cifras%20Sectoriales%20-%202018%20Mayo%20Cadena%20L%C3%A1ctea.pdf>
- Mohd Sajjad Ahmad Khan, I. A. (2011). In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*, 19, 48-55.
- Mundy, L., Pendry, B., & Rahman, M. (2016). Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine. *Journal of Herbal Medicine*, 6, 53-58.
- NCCLS. (2000). Documento M2-A7 del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico de los EE. UU.
- Olmedo, R., Nepote, V., & Grosso, N. (2014). Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. *Food Chemistry*, 156, 212-219.
- Patiño, J. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los extractos etanólicos, etéreos y fracciones de las inflorescencias y hojas de *Achyrocline bogotensis*. Bogotá: Universidad Distrital "Francisco José de Caldas".
- Pérez, O. P., & Lazo, F. J. (2010). ENSAYO DE ARTEMIA: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES. *Revista de Protección Vegetal*, 25; 34-43.
- Perini, R., P., N. C., R., B. F., A., C. D., & G., a. C. (2014). Antimicrobial activity of essential oils against pathogens isolated from Bovine Mastitis. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, 4(2), 6-15.



- Picazo, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades.*
- Pozzatti, P., Loreto, É., Mario, D. N., Rossato, L., & Santurio, J. (2010). Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. *Journal de Mycologie Médicale*, 20, 185-189.
- Pozzo, M. D., Santurio, D., Rossatto, L., Vargas, A., & Alves, S. (2011). Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus spp.* isolated from bovine mastitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 63(5), 1229-1232.
- Ramírez, H. E., Virgen-Calleros, G., Vargas-Radillo, J. d., Salcedo- Pérez, E., & Barrientos-Ramírez, L. (2015). Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de hoja de *Guazuma ulmifolia* Lam. contra fitopatógenos. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 6(27).
- Ramirez, S. (2018). *Retrospectiva del sector lácteo en Colombia*. Universidad de Antioquia: Tesis de grado.
- Rico, N. L. (2009). Evaluación del efecto antiadrenérgico alfa de extractos de *Achyrocline bogotensis* (vira- vira) en anillos de aorta aislada de rata. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Rodríguez, e. V. (2016). Evaluación de tres selladores de barrera para el control de células somáticas e incidencia de mastitis en bovinos de leche en san rafael de vara blanca, heredia. *Instituto tecnológico de costa rica. Sede regional san carlos.*
- Rülhe, J., & Calderon, A. (2011). Aceites Esenciales: un aporte adicional de proteína digestible en la ración. *Mundo Ganadero, Noviembre Diciembre*, 50-52.

- Sabo, V. A., & PetarKnezev. (2019). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Industrial Crops and Products*, 132, 413-429.
- Santamarina, M. P., Rosello, J., Gimenez, S., & Blazquez, M. A. (2016). Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. *Food Science and Technology*, 65, 325-332.
- Stashenko, E., Martínez, J., Ruíz, C., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93-103.
- Véler, R. A., & Delgador, J. M. (2009). Consumo de frutos de arbóreas en pasturas naturalizadas de Nicaragua. Primer Simposio en Producción Animal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 25-91.
- Villamizar, L. B., Mosquera, N. H., Piñeros, A. L., Muñoz, P. B., & Ospina, L. M. (2014). *Guazuma ulmifolia*. Bogotá: Escuela de Medicina. Fundación Universitaria Juan N. Corpas.
- Zhengkai, W., Ershun, Z., Changming, G., Yunhe, F., Yuqiang, Y., Yimeng, L., . . . Zhengtao, Y. (2014). Thymol inhibits *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF-kB activation. *Microbial Pathogenesis*, 71-72, 15-19.

# 14 ANEXOS

Anexo Uno: Protocolo Diff –quik™

**RAL DIFF-QUIK™ EZ KIT (3x100ml)** REF : 720550-0000

**RAL DIFF-QUIK™ KIT (3x0,5L)** REF : 720555-0000

FAST STAINING KIT

## Staining procedures:

### Haematology: Blood Smears

Veterinary Parasitology: *Piroplasma*,  
*M. pachydermatis*

#### Length of one Test: 15 seconds

- Dip the slide 5 x 1 second in solution RAL Diff-Quik™ Fixative solution (bottle ❶). Drain surplus solution onto filter paper
  - Dip the slide 5 x 1 second in RAL Diff-Quik™ Solution I (bottle ❷). Drain surplus solution onto filter paper
  - Dip the slide 5 x 1 second in RAL Diff-Quik™ Solution II (bottle ❸).
- Rinse the slide with distilled water.

### Haematology: Bone marrow

#### Length of one Test: 3 minutes

- Dip the slide 1 minute in solution RAL Diff-Quik™ Fixative solution (bottle ❶). Drain surplus solution onto filter paper.
- Dip the slide 1 minute in Diff-Quik™ Solution I (bottle ❷). Drain surplus solution onto filter paper.
- Dip the slide 1 minute in RAL Diff-Quik™ Solution II (bottle ❸). Drain surplus solution onto filter paper.
- Rinse the slide with distilled water.

### Cytology: Spermocytograms

#### Length of one Test: 1 minute and 20 seconds

- Dip the slide 1 minute in solution RAL Diff-Quik™ Fixative solution (bottle ❶). Drain surplus solution onto filter paper.
  - Dip the slide 25 seconds in RAL Diff-Quik™ Solution I (bottle ❷). Drain the excess solution onto filter paper.
  - Dip the slide 25 seconds in RAL Diff-Quik™ Solution II (bottle ❸).
- Rinse the slide with distilled water.

### Cyto-bacteriology: cytology of biological fluids, urines, cytopunctures and CSF

#### Length of one Test: 15 seconds

- (1minute 4 seconds for CSF)
- Dip the slide 5 seconds (1 minute for CSF) in solution RAL Diff-Quik™ Fixative solution (bottle ❶). Drain surplus solution onto filter paper.
  - Dip the slide 5 seconds (2x1 second for CSF) in Diff-Quik™ Solution I (bottle ❷). Drain surplus solution onto filter paper.
  - Dip the slide 5 seconds (2x1 second for CSF) in RAL Diff-Quik™ Solution II (bottle ❸).
- Rinse the slide with distilled water.

#### **EFFECTOS ADVERSOS**

En los fenómenos de intolerancia a los productos yodados intervienen, por una parte, factores del sujeto expuesto, hipersensibilidad de la piel, alergia al yodo, etc. y por la otra, las propiedades irritantes o sensibilizantes, grados de concentración y tiempo de aplicación de los diversos componentes.

Aunque la tolerancia por parte de la piel y las mucosas es elevada, ante casos de irritación o alergia suprimir la aplicación del producto.

#### **INTOXICACIÓN**

Por la forma de presentación y la vía de aplicación no presenta problemas de intoxicación en las dosis aplicadas.

#### **PRECAUCIONES**

Para una correcta eficacia en la utilización del producto no deberían transcurrir más de 2 minutos entre el final del ordeño y el sellado del pezón.

Evitar contacto con piel y mucosas en la manipulación del producto.

Mantener fuera del alcance de los niños.

Almacenar los desinfectantes de pezones en áreas frescas y limpias.

Mantener los recipientes cerrados para prevenir la contaminación.

No utilizar luego del vencimiento.

Utilizar el producto a la concentración recomendada. **NO DILUIR.**

No retorne el desinfectante usado al envase original.

No utilice esponjas en las copas de aplicación.

#### **CALIDAD DEL PRODUCTO**

Causas que varían la calidad: calor, luz, humedad, presencia de sustancias oxidantes externas y microorganismos.

El producto no debe ser expuesto a la luz solar directamente.

Conservación correcta: conservar el producto en lugar fresco y seco.

No exponerlo a temperaturas mayores a 25 °C y no menores a 5°C

Mantener el envase cerrado durante los lapsos en que no sea utilizado.

#### **VENCIMIENTO (período de validez)**

Utilizar el producto dentro de los 2 años de su fecha de elaboración

#### **PRESENTACIONES**

Envases por 5, 10, 20, 25, 60 y 200 Litros.